



(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)



2-0003671

(51) **C12Q 1/6858**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00025

(22) 25/03/2021

(67) 1-2021-01612

(45) 25/09/2024 438

(43) 26/07/2021 400

(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 MŌI ĐẶC HIỆU ALEN ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ PHÂN BIỆT THỂ ĐỒNG HỢP
TỬ/DỊ HỢP TỬ CỦA ALEN HLA-A*33:03**

(57) Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học phân tử và phân tích gen, cụ thể là sáng chế đề xuất bộ mồi đặc hiệu 04 cặp mồi đặc hiệu alen có khả năng phát hiện đồng thời phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 để sàng lọc alen HLA-A*33:03. Bằng cách thiết kế các cặp mồi đặc hiệu nhân chọn lọc các alen HLA-A*33:03 bằng kỹ thuật PCR hai bước cho phép xác định được các thể đồng hợp tử/dị hợp tử nhằm hạn chế nguy cơ dị ứng nhiều thuốc liên quan tới alen này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học phân tử và xét nghiệm gen, cụ thể là đề cập đến bộ môi đặc hiệu alen được thiết kế có nucleotit không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN nhằm phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử và dị hợp tử của alen HLA-A*33:03.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gen mã hóa phức hợp hòa hợp tổ chức chính (Major Histocompatibility Complex - MHC) hay còn được gọi là kháng nguyên bạch cầu người (Human Leucocyte Antigen - HLA) trải dài khoảng 4 Mbp trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 (từ 6p21.1 đến 6p21.3) (Berlingiero Michele, Bonchi Francesco, et al. (2009), "Mining Clinical, Immunological, and Genetic Data of Solid Organ Transplantation", 224, pp. 211-236). Siêu họ gen HLA này chỉ chiếm khoảng 0,1% chiều dài bộ gen người, nhưng lại chứa khoảng 0,6% tổng số gen người đã được xác định. Do đó, có thể nói HLA là hệ thống gen có mật độ gen dày nhất trong bộ gen người (Carapito R., Radosavljevic M., et al. (2016), "Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies", Hum Immunol, 77(11), pp. 1016-1023). HLA được chia làm 3 lớp, lớp I, lớp II và lớp III. Mỗi lớp chứa nhiều gen mã hóa cho các protein tham gia vào hoạt động miễn dịch của cơ thể, trong đó, HLA lớp I được phân thành nhiều typ với 3 typ chính HLA-A, HLA-B, HLA-C liên quan nhiều nhất đến các phản ứng thuốc.

HLA lớp I, typ A (HLA-A) nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể số 6 tại vị trí 6p22.1, có kích thước 4625 bazơ, bắt đầu từ nucleotit 29.941.269 đến 29.945.884. Gen HLA-A có tính đa hình cao với 6425 alen và 2803 đa hình đơn nucleotit (SNP) đã được ghi nhận (GeneCards®: The Human Gene

Database. Rehovot Israel: Weizmann Institute of Science; 2021. Đường link: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-A#snp>; IPD-IMGT/HLA Database. Cambridgeshire: EMBL-EBI The Wellcome Genome Campus; 2019, <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>. Nhiều alen HLA-A, trong đó phải kể tới alen HLA-A*33:03 được phát hiện liên quan tới phản ứng có hại của một loạt các thuốc khác nhau, đặc biệt là ở các quần thể người châu Á (The Allele Frequency Net Database. Liverpool: Royal Liverpool University Hospital University of Liverpool, 2020, http://www.allelefrequencys.net/hla-adr/adr_data_source.asp).

Một nghiên cứu được thực hiện trên người Đài Loan cho thấy nguy cơ mắc phản ứng có hại trên da nghiêm trọng (SCARs) do thuốc điều trị tăng axit uric máu allopurinol ở người mang alen HLA-A*33:03 cao hơn 7,3 lần so với người không mang alen này (OR = 7,3, p = 0,047) (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). Đối với người Hàn Quốc, nguy cơ này lên tới 20,5 lần nếu mang alen HLA-A*33:03 so với người không mang alen (OR = 20,5, p = $3,31 \times 10^{-6}$) (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). Một nghiên cứu khác thực hiện trên người Hán tại Trung Quốc lại phát hiện alen HLA-A*33:03 làm tăng nguy cơ mắc SCARs do thuốc điều trị loãng xương strontium ranelate lên gấp 19,4 lần (OR = 19,4, p = 0,006) (Lee H. Y., Shen M. X., et al. (2016), "Increased risk of strontium ranelate-related SJS/TEN is associated with HLA", *Osteoporos Int*, 27(8), pp. 2577-83). Một nghiên cứu phân tích gộp tìm thấy mối liên quan của alen HLA-A*33:03 với SJS/TEN (một thể SCARs nặng với tỷ lệ tử vong cao) gây ra bởi các loại thuốc chữa cảm cúm thông thường không chứa với OR = 2,28; 95% CI = 1,31–3,97) (Tangamornsuksan Wimonchat, Chanprasert Sirikan, et al. (2020), "HLA genotypes and cold medicine-

induced Stevens–Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis with severe ocular complications: a systematic review and meta-analysis", *Scientific Reports*, 10:e10589). Bên cạnh đó, một nghiên cứu khác thực hiện trên người Nhật Bản ghi nhận alen HLA-A*33:03 là một yếu tố nguy cơ gây ngộ độc gan ứ mật do thuốc chống kết tập tiểu cầu ticlopidine với $OR = 36,5$, $p = 7,32 \times 10^{-7}$ (Hirata K., Takagi H., et al. (2008), "Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case–control study", *The Pharmacogenomics Journal*, 8(1), pp. 29-33). Do đó, alen HLA-A*33:03 có thể được sử dụng làm chỉ thị sinh học trong cá thể hóa điều trị ở người châu Á để phát hiện những người có nguy cơ gặp phải phản ứng thuốc, nhằm lựa chọn những phác đồ thay thế an toàn hơn. Hơn nữa, alen này có tần suất cao ở người châu Á, ví dụ như 16,07% ở người Hàn Quốc (In J. W., Roh E. Y., et al. (2015), "Allele and Haplotype Frequencies of Human Leukocyte Antigen-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 From Sequence-Based DNA Typing Data in Koreans", *Ann Lab Med*, 35(4), pp. 429-35), 11,17% ở người Thái Lan (Satapornpong P., Jinda P., et al. (2020), "Genetic Diversity of HLA Class I and Class II Alleles in Thai Populations: Contribution to Genotype-Guided Therapeutics", *Front Pharmacol*, 11:e78).

Hiện việc phát hiện đặc hiệu alen HLA-A*33:03 được thực hiện thông qua các phương pháp như giải trình tự (Peterson Trevor, Bielawny Thomas, et al. (2014), "Diversity and Frequencies of HLA Class I and Class II Genes of an East African Population", *Open Journal of Genetics*, 04, pp. 99-124), đầu dò oligonucleotit có trình tự đặc hiệu -SSOP (Hoa B. K., Hang N. T., et al. (2008), "HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam", *Tissue Antigens*, 71(2), pp. 127-34), PCR theo thời gian thực -Realtime PCR (Koehler Rebecca N, Walsh Anne M, et al. (2010), "High-throughput high-resolution class I HLA genotyping in East Africa", 5(5): e10751) hay PCR với hàng chục cặp mồi có trình tự đặc hiệu

SSP-PCR nhằm sàng lọc hàng loạt alen HLA) đều đòi hỏi chi phí cao, thực hiện phức tạp, tốn thời gian và chỉ phù hợp với mục đích nghiên cứu, không phù hợp để ứng dụng trong thực hành lâm sàng.

Tại Việt Nam, chưa có một nghiên cứu nào đánh giá mối liên quan của alen HLA-A*33:03 với nguy cơ mắc phản ứng có hại do thuốc cũng như chưa có công bố nào về quy trình phát hiện alen này. Như vậy vẫn cần có một nghiên cứu toàn diện nhằm đánh giá mối liên quan của alen HLA-A*33:03 với nguy cơ gặp phản ứng không mong muốn khi dùng nhiều loại thuốc khác nhau, tiến tới áp dụng một xét nghiệm đơn giản, độ chính xác cao trên lâm sàng giúp phát hiện những người mang alen nguy cơ này, để từ đó có những điều chỉnh phù hợp trong phác đồ điều trị. Điều kiện đầu tiên là cần thiết kể một bộ môi có thể sử dụng trong quy trình đơn giản, chi phí thấp, cho độ chính xác cao để phát hiện đặc hiệu alen HLA-A*33:03 thay vì phải sàng lọc hàng loạt alen HLA-A như các phương pháp đã trình bày ở trên.

Do tính đa hình của gen HLA, nên các phương pháp SSOP, Realtime-PCR hay SSP-PCR để phân biệt được thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 đều cần nhiều cặp môi (thường từ 10 cặp môi trở lên). Việc sử dụng nhiều cặp môi cùng lúc dẫn tới quá trình thực hiện phức tạp, tốn kém về hóa chất, tiêu hao vật tư và mẫu thử.

Do đó, vẫn cần bộ môi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 cho phép sử dụng trong nghiên cứu cũng như xét nghiệm lâm sàng giúp sàng lọc nhanh alen HLA-A*33:03 với số lượng môi ít hơn, dễ dàng thực hiện bằng thiết bị và quy trình PCR đơn giản, chi phí thấp, độ nhạy cao thay thế những kit xét nghiệm với nhiều cặp môi hoặc chi phí cao như phương pháp giải trình tự gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề xuất bộ môi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen

HLA-A*33:03 dùng trong nghiên cứu cũng như phân tích lâm sàng giúp sàng lọc nhanh alen HLA-A*33:03 bằng kỹ thuật PCR hai bước với chi phí thấp và độ nhạy cao.

Sáng chế đề cập đến bộ môi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 bao gồm 04 cặp môi, trong đó:

- cặp môi thứ nhất có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2, trong đó cặp môi này khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 tập trung các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A;

- cặp môi thứ hai có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4, trong đó cặp môi này khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 18 alen HLA-A, nhưng không khuếch đại 3 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và HLA-A*33:03 với môi xuôi nêu trong SEQ ID No.3 có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là a mà không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A;

- cặp môi thứ ba có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6 để khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01, trong đó mỗi trình tự này đều có nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A; và

- cặp môi thứ tư có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.7 để khuếch đại đặc hiệu alen HLA-A*33:03, trong đó mỗi trình tự này đều có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp với ADN của các alen HLA-A.

Bộ môi theo sáng chế bao gồm 04 cặp môi đặc hiệu alen được sử dụng trong quy trình PCR 2 bước để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03, trong đó cặp môi thứ nhất được sử dụng trong PCR bước 1 và các cặp môi thứ hai, cặp môi thứ ba và cặp môi thứ tư được sử dụng trong PCR bước 2, dựa trên kết quả điện di, cho phép xác định các thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03.

Cặp mồi thứ nhất trong bộ mồi theo sáng chế được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 của gen HLA-A bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID No.2, trong đó cặp mồi này được thiết kế với mồi xuôi có một nucleotit đầu 3' và mồi ngược có hai nucleotit liên tiếp tại đầu 3' không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN để tránh khuếch đại gen HLA-C và HLA-G vốn có trình tự tương đồng cao với gen HLA-A.

Cặp mồi thứ hai trong bộ mồi theo sáng chế có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4, trong đó cặp mồi này được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 18 alen HLA-A, nhưng không khuếch đại 3 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và HLA-A*33:03 với mồi xuôi nêu trong SEQ ID No.3 có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là a mà không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A.

Cặp mồi thứ ba trong bộ mồi theo sáng chế có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6, trong đó cặp mồi này được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01, trong đó mỗi trình tự này đều có nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A.

Cặp mồi thứ tư trong bộ mồi theo sáng chế có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.7, trong đó cặp mồi này được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu alen HLA-A*33:03, trong đó mỗi trình tự này đều có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp với ADN của các alen HLA-A.

Bộ mồi theo sáng chế dùng trong phương pháp PCR hai bước để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 với bước PCR thứ nhất sử dụng cặp mồi nêu trong SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2 để khuếch đại exon 2-3 tập trung các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A; và bước PCR thứ hai sử dụng đa mồi với các cặp mồi nêu trong

SEQ ID No.1 đến SEQ ID No.7 để nhân các đoạn gen cho phép xác định các alen HLA-A*33:03.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ nguyên lý sử dụng bộ mồi theo sáng chế trong PCR hai bước để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03. (A) là hình vẽ sơ đồ vị trí khuếch đại đoạn gen HLA-A trong PCR bước một sử dụng cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2 cho sản phẩm kích thước 992bp. (B) là vị trí và kích thước khuếch đại trong PCR bước hai sử dụng các mồi có trình tự SEQ ID No.3 đến SEQ ID No.7 để khuếch đại ba đoạn gen đặc hiệu, từ đó cho phép kết luận kiểu gen của alen HLA-A*33:03 từ các kết quả điện di sản phẩm PCR.

Hình 2 là kết quả so sánh trình tự thể hiện vị trí gắn trên ADN của cặp mồi thứ nhất có trình tự nêu trong SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2 sử dụng ở bước 1 của quy trình PCR. (A) thể hiện vị trí gắn của mồi xuôi SEQ ID No.1 (B) thể hiện vị trí gắn của mồi SEQ ID No.2. Các nucleotit được tô đậm là những nucleotit không bắt cặp bổ sung với ADN của gen HLA-C và HLA-G để không khuếch đại không đặc hiệu với 2 gen này. Khung vuông thể hiện vị trí gắn của mồi trên ADN.

Hình 3 thể hiện vị trí gắn trên ADN của các mồi đặc hiệu alen sử dụng ở bước 2 của quy trình PCR. (A) vị trí gắn của 2 mồi xuôi SEQ ID No.3 và SEQ ID No.5, (B) vị trí gắn của 2 mồi ngược SEQ ID No.6 và SEQ ID No.7. Các vị trí không bắt cặp trên đoạn mồi được in đậm. Khung vuông thể hiện vị trí gắn của mồi trên ADN.

Hình 4 là kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng bộ mồi đặc hiệu alen theo sáng chế để phát hiện và phân biệt 07 mẫu đối chứng ADN đã biết kiểu gen HLA-A. (A) kết quả điện di sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi thứ nhất (SEQ ID No.1/SEQ ID No.2) có kích thước 992 bp. (B) kết quả điện di sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi thứ hai (SEQ ID No.3/SEQ

ID No.4) có kích thước 358 bp; (C) kết quả điện di sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi thứ ba (SEQ ID No.5/SEQ ID No.6) có kích thước 202 bp; (D) kết quả điện di sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi thứ tư (SEQ ID No.5/SEQ ID No.7) có kích thước 202 bp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến bộ mồi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 bao gồm 04 cặp mồi được thiết kế nhằm phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03, là một trong số 6425 alen đa hình của gen HLA-A đã được phát hiện. Các cặp mồi này có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 -7. Trình tự nucleotit của alen HLA-A*33:03 sử dụng để thiết kế các cặp mồi được nêu trong SEQ ID No.8.

Trình tự nucleotit của alen HLA-A*33:03 có đặc điểm được mô tả trong Bảng 1 và các Hình 2, Hình 3.

Giống như các alen đa hình của gen HLA-A nói chung, trình tự alen HLA-A*33:03 có sự tương đồng với 2 gen HLA-C và HLA-G, trong đó có sự khác biệt tại nucleotit a ở vị trí 418 (nằm ở intron 1) và 2 nucleotit liền nhau ac ở vị trí 1363 và 1364 (nằm ở intron 3) (Hình 2).

Vùng exon 2-3 của alen HLA-A*33:03 trải dài từ nucleotit thứ 503 đến nucleotit thứ 1289, tập trung các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của alen này và có độ tương đồng cao với 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01. Nhóm 3 alen này đều có nucleotit a tại vị trí 527, trong khi 18 alen HLA-A còn lại vị trí này là t (Hình 3A).

Bên cạnh đó, nucleotit tại vị trí 691 của alen HLA-A*33:03 là c, trong khi 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01 tương ứng lại là g (Hình 3B).

Bảng 1. Vị trí nucleotit trên khuôn ADN của alen HLA-A*33:03 dùng để thiết kế các môi đặc hiệu alen

Vị trí nucleotit alen/gen	418	527	691	1363	1364
HLA-A *29:01	a	a	g	a	c
HLA-A *31:01	a	a	g	a	c
HLA-A *33:03	a	a	c	a	c
18 alen HLA-A còn lại	a	t	g/c	a	c
gen HLA-C	g	-	-	g	a
gen HLA-G	g	-	-	g	a

Từ đặc điểm trình tự của alen HLA-A*33:03 có thể thấy rất khó có thể khuếch đại trực tiếp alen này do tính đa hình quá cao của các alen HLA-A nói riêng và sự tương đồng trong trình tự nucleotit giữa các tuýp HLA lớp I nói chung (HLA-A, HLA-C, HLA-G).

Bộ môi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 theo sáng chế bao gồm 04 cặp môi có trình tự nêu trong SEQ ID No.1-7, trong đó:

Cặp môi thứ nhất có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2, trong đó cặp môi này khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 tập trung các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A. Cặp môi này được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 tập trung tất cả các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A. Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 992 bp. Trong đó, môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 được thiết kế với một nucleotit (vị trí a in đậm ở SEQ ID No.1 nêu trong Bảng 1) và môi ngược SEQ ID No.2 có hai nucleotit liên tiếp (vị trí gt in đậm ở SEQ ID No.2 nêu trong Bảng 1) mà không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của gen HLA-C và HLA-G, do đó cặp môi này không khuếch đại 2 gen này (Hình 2). Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 992bp được dùng làm khuôn cho PCR bước 2. Cặp môi thứ nhất này đồng thời đóng vai trò là cặp môi nội

kiểm để kiểm tra chất lượng ADN của mẫu thử và hoạt động của hỗn hợp phản ứng.

Trình tự nucleotit và thông số của cặp mỗi thứ nhất được nêu trong bảng 2 với vị trí nucleotit được thiết kế không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của 2 gen HLA-C và HLA-G được in đậm:

Bảng 2. Trình tự và các thông số của cặp mỗi thứ nhất

Mỗi	Trình tự (chiều 5'-3')	Chiều dài	Sản phẩm PCR	Tm (°C)
SEQ ID No.1	cggcctctgt ggggagaag ca	21	992 bp	70
SEQ ID No.2	gatattctag tgttggtccc aatt gt	26		72

Cặp mỗi thứ hai có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4, trong đó cặp mỗi này khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 18 alen HLA-A đã được phát hiện ở cộng đồng người Kinh, Việt Nam. Cặp mỗi này được thiết kế sao cho không khuếch đại 3 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và HLA-A*33:03 với mỗi xuôi nêu trong SEQ ID No.3 có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là a mà không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A. Sản phẩm PCR của cặp mỗi này có kích thước 358 bp. Trong đó, mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 được thiết kế với một nucleotit không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A, cụ thể là nucleotit tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3 của mỗi xuôi của trình tự SEQ ID No.3 được thiết kế là a thay vì t, vốn bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A.

Cặp mỗi thứ ba có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6 để khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01. Trong đó mỗi trình tự này đều có nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a được thiết kế không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A. Sản phẩm PCR của cặp mỗi này có kích thước 202 bp. Cặp mỗi này được thiết kế với một nucleotit không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN. Cụ thể là nucleotit tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3 của mỗi xuôi của trình tự SEQ ID No.5

và SEQ ID No.6 được thiết kế là a thay vì t, vốn bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A.

Cặp mỗi thứ tư có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.7 để khuếch đại đặc hiệu alen HLA-A*33:03. Trong đó mỗi trình tự này đều có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp với ADN của các alen HLA-A. Sản phẩm PCR của cặp mỗi này có kích thước 202 bp. Cặp mỗi này được thiết kế với một nucleotit không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN. Cụ thể là nucleotit tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3' của mỗi xuôi của trình tự SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6 được thiết kế là a thay vì g, vốn bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A.

Trình tự nucleotit và thông số của cặp mỗi thứ hai, thứ ba và thứ tư được nêu trong Bảng 3 với vị trí nucleotit được thiết kế không bắt cặp bổ sung đặc hiệu được in đậm.

Bảng 3. Trình tự và các thông số của cặp mỗi thứ hai, thứ ba và thứ tư

Môi	Trình tự (chiều 5'-3')	Chiều dài	Sản phẩm PCR	Tm (°C)
Cặp mỗi thứ hai				
SEQ ID No.3	cccactccat gaggtattac t	21	358 bp	62
SEQ ID No.4	ctcggacccg gagactgt	18		60
Cặp mỗi thứ ba				
SEQ ID No.5	cccactccat gaggtattac a	21	202 bp	62
SEQ ID No.6	ggccttcaca ttccgtatc	19		58
Cặp mỗi thứ tư				
SEQ ID No.5	cccactccat gaggtattac a	21	202 bp	62
SEQ ID No.7	ggccttcaca ttccgtatg	19		58

Bộ mỗi theo sáng chế bao gồm 04 cặp mỗi đặc hiệu alen được sử dụng trong quy trình PCR 2 bước để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03. Trong đó cặp mỗi thứ nhất được sử dụng trong PCR bước 1 và các cặp mỗi thứ hai, cặp mỗi thứ ba và cặp mỗi thứ tư được

sử dụng trong PCR bước 2. Dựa trên kết quả điện di, cho phép xác định các thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03. Kết hợp kết quả điện di của 3 cặp môi sử dụng ở bước 2 để kết luận kiểu gen của alen HLA-A*33:03 (Hình 1).

Như vậy, bộ môi theo sáng chế bao gồm 7 trình tự với 4 cặp môi, trong đó sử dụng một môi chung (SEQ ID No.5) cho phép làm giảm số lượng cặp môi so với các bộ kit thương mại (thường gồm từ 10 cặp môi trở lên để sàng lọc hàng loạt các alen). Số lượng cặp môi sử dụng giảm đi tối thiểu 2,5 lần, nhờ vậy quá trình thực hiện diễn ra đơn giản hơn, tiết kiệm được chi phí về hóa chất, vật tư tiêu hao, mẫu thử. Bên cạnh đó, trong bộ môi đặc hiệu alen đề xuất, cặp môi thứ nhất có thể kiêm cả vai trò cặp môi nội kiểm nên không cần thêm cặp môi nội kiểm khuếch đại gen khác gen HLA (beta-actin, beta-globin...) như bộ kit thương mại trên thị trường.

Bộ môi đề xuất trong sáng chế này được thiết kế với cả môi xuôi và môi ngược của cặp môi thứ ba và cặp môi thứ tư đều có 01 nucleotit không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3' của môi để tăng tính đặc hiệu. Quy tắc thiết kế vị trí không bắt cặp trên môi đặc hiệu alen được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Quy tắc thiết kế vị trí không bắt cặp trên môi đặc hiệu alen

Mã IUPAC của 1 SNP	Alen mang SNP	Vị trí không bắt cặp giữa môi và khuôn ADN (Môi xuôi/ngược)	Mức độ mạnh yếu của vị trí không bắt cặp giữa môi và khuôn ADN tại vị trí 3'	Nucleotit không bắt cặp thứ 2 được thêm vào môi ở vị trí thứ 3 (hoặc vị trí khác) kể từ nucleotit đầu 3'
r	g/a	g/t a/c	YẾU YẾU	g/a,t/c a/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

Căn cứ vào quy tắc thiết kết vị trí không bắt cặp vào mỗi trình bày ở Bảng 4, nhóm tác giả lựa chọn vị trí nucleotit không bắt cặp như sau:

Nhóm 18 alen HLA-A và nhóm 3 alen có độ tương đồng cao HLA-A*29:01, HLA-A*31:01, HLA-A*33:03 phân biệt bởi SNP a/t ở nucleotit thứ 527 (Hình 3A). Do đó, theo quy tắc thêm nucleotit không bắt cặp trên mỗi đặc hiệu alen, mỗi xuôi SEQ ID No.3 (đặc hiệu với nhóm 18 alen HLA-A khác) và mỗi xuôi SEQ ID No.5 (đặc hiệu với nhóm 3 alen HLA-A có độ tương đồng cao) cần 01 nucleotit không bắt cặp trung bình ở vị trí thứ 2 hoặc thứ 3 kể từ nucleotit đầu 3'. Nếu nucleotit không bắt cặp ở vị trí thứ 2 tính từ nucleotit đầu 3' thì mỗi xuôi SEQ ID No.3 sẽ có trình tự như sau 5'- cccactccat gaggtatttg- 3' và mỗi xuôi SEQ ID No.5 sẽ có trình tự như sau 5'- cccactccat gaggtatttg a- 3'; như vậy 2 mỗi xuôi này có tới 6 trong 7 nucleotit đầu 3' là a, t và 01 nucleotit không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A, dẫn đến lực liên kết của mỗi với khuôn ADN quá yếu để thực hiện phản ứng khuếch đại tạo sản phẩm PCR. Do đó thiết kế mỗi được thực hiện bằng cách bổ sung nucleotit không bắt cặp ở vị trí thứ 3 tính từ nucleotit đầu 3' của 2 mỗi xuôi SEQ ID No.3 và SEQ ID No.5. Cụ thể là nucleotit tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3' của 2 mỗi xuôi trên là a thay vì nucleotit t vốn bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A) (Hình 3A) nhằm 2 mục tiêu vừa đảm bảo độ đặc hiệu của mỗi mỗi, vừa đảm bảo khả năng gắn của mỗi vào khuôn ADN để thực hiện phản ứng khuếch đại.

Nhóm 2 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và alen HLA-A*33:03 phân biệt bởi SNP g/c ở nucleotit thứ 691 (Hình 3B). Do đó, theo quy tắc thêm nucleotit không bắt cặp trên mỗi đặc hiệu alen, mỗi ngược SEQ ID No.6 (đặc hiệu với nhóm 2 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01) và mỗi ngược SEQ ID No.7 (đặc hiệu với alen HLA-A*33:03) cần 01 nucleotit không bắt cặp trung bình ở vị trí thứ 2 hoặc thứ 3 kể từ nucleotit đầu 3'. Nếu nucleotit không bắt cặp ở vị trí thứ 2 tính từ nucleotit đầu 3' thì mỗi xuôi SEQ ID No.6 sẽ có trình tự như sau 5'- ggccttcaca ttccgtcac - 3' và mỗi ngược SEQ ID No.7 sẽ có trình

tự như sau 5'- ggccttcaca ttccgtcag - 3'. Tuy nhiên, quá trình thử nghiệm 2 môi ngược này với các mẫu chứng ADN đã biết kiểu gen HLA-A cho kết quả không đặc hiệu. Vì vậy, việc thiết kế lựa chọn vị trí thứ 3 tính từ nucleotit đầu 3' để đưa vào vị trí nucleotit không bắt cặp mạnh cho 2 môi ngược SEQ ID No.6 và SEQ ID No.7. Cụ thể là nucleotit tại vị trí thứ 3 tính từ đầu 3' tận của 2 môi ngược trên là a thay vì nucleotit g, vốn bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A (Hình 3B) nhằm đảm bảo độ đặc hiệu của mỗi môi.

Như vậy, các đặc điểm thiết kế của bộ 04 cặp môi đặc hiệu alen với cách lựa vị trí để đặt nucleotit không bắt cặp trên môi và lựa chọn mức độ mạnh yếu của nucleotit không bắt cặp là điểm khác biệt của sáng chế này. Kết hợp sự xuất hiện của sản phẩm PCR đặc hiệu của từng cặp môi cho phép phát hiện đồng thời phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thử nghiệm khả năng phát hiện và phân biệt alen HLA-A*33:03

Sử dụng 07 mẫu chứng ADN đã biết trước kiểu gen HLA-A để thử nghiệm với bộ môi đặc hiệu alen theo sáng chế. Thứ tự sử dụng các cặp môi được thể hiện ở Hình 1A theo quy trình PCR hai bước.

Bước 1 của quy trình PCR: sử dụng cặp môi SEQ ID No.1/SEQ ID No.2 để khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 tập trung tất cả các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A, quá trình này được thực hiện theo quy trình PCR chuẩn.

Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 992 bp, xuất hiện ở tất cả các giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (Hình 4A). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR lần 2.

Tiến hành pha loãng 100 lần sản phẩm PCR thu được từ bước 1 à sử dụng làm khuôn khuếch đại với 3 cặp môi trong PCR bước 2.

Bước 2 của quy trình PCR: sử dụng đồng thời 3 cặp môi SEQ ID No.3/SEQ ID No.4; SEQ ID No.5/SEQ ID No.6 và SEQ ID No.5/SEQ ID

No.7 (Hình 1A). Mỗi cặp môi được cho vào hỗn hợp phản ứng ở các ống phản ứng riêng biệt.

Cặp môi thứ hai SEQ ID No.3/SEQ ID No.4 khuếch đại đặc hiệu tất cả các alen HLA-A khác đã phát hiện ở cộng đồng người Kinh, Việt Nam, ngoài 3 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và HLA-A*33:03. Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 358 bp - xuất hiện ở các giếng 2, 3, 4, 5, 6, 7 (Hình 4B).

Cặp môi thứ ba SEQ ID No.5/SEQ ID No.6 khuếch đại đặc hiệu 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01. Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 202 bp - xuất hiện ở các giếng 4, 5, 6, 7 (Hình 4C).

Cặp môi thứ tư SEQ ID No.5/SEQ ID No.7 khuếch đại đặc hiệu alen HLA-A*33:03. Sản phẩm PCR của cặp môi này có kích thước 202 bp - xuất hiện ở các giếng 1, 2 (Hình 4D).

So sánh kết quả kiểu gen của 07 mẫu chứng ADN khi sử dụng bộ môi đặc hiệu alen vừa thiết với kết quả kiểu gen đã biết cho thấy độ tương đồng 100%, thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. So sánh kết quả kiểu gen của mẫu chứng ADN khi sử dụng bộ môi đặc hiệu alen vừa thiết kế và kết quả kiểu gen HLA-A đã biết

Mẫu chứng	Kiểu gen HLA-A đã biết	Kết quả điện di của các cặp môi bước 2			Kết luận kiểu gen HLA-A*33:03
		SEQ ID No.3-4	SEQ ID No.5-6	SEQ ID No.5, 7	
1	A*33:03/*33:03	-	-	+	Đồng hợp tử A*33:03
2	A*33:03/*02:07	+	-	+	Dị hợp tử A*33:03
3	A*11:01/*24:02	+	-	-	Âm tính với A*33:03
4	A*11:01/*29:01	+	+	-	Âm tính với A*33:03
5	A*02:07/*29:01	+	+	-	Âm tính với A*33:03
6	A*02:07/*31:01	+	+	-	Âm tính với A*33:03
7	A*11:01/*31:01	+	+	-	Âm tính với A*33:03

Ví dụ 2: Đánh giá tính đặc hiệu của bộ mồi

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách tiến hành xác định kiểu gen HLA-A của 100 mẫu ADN chưa biết kiểu gen đồng thời bằng phương pháp PCR gồm 2 bước sử dụng bộ 04 cặp mồi đặc hiệu alen theo sáng chế như nêu trong Ví dụ 1 và bằng phương pháp giải trình tự.

Kết quả so sánh kết quả kiểu gen của các mẫu thử, cho thấy độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp PCR 2 bước sử dụng bộ 04 cặp mồi đặc hiệu alen đề xuất nói trên so với phương pháp giải trình tự là 100%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bộ mỗi đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp tử/dị hợp tử của alen HLA-A*33:03 bao gồm 04 cặp mỗi, trong đó:

- cặp mỗi thứ nhất có trình tự nêu trong SEQ ID No.1 và SEQ ID No.2, trong đó cặp mỗi này khuếch đại đặc hiệu vùng exon 2-3 tập trung các đa hình đơn nucleotit (SNP) đặc trưng của gen HLA-A;

- cặp mỗi thứ hai có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4, trong đó cặp mỗi này khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 18 alen HLA-A, nhưng không khuếch đại 3 alen HLA-A*29:01, HLA-A*31:01 và HLA-A*33:03 với mỗi xuôi nêu trong SEQ ID No.3 có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là a mà không bắt cặp với khuôn ADN của các alen HLA-A;

- cặp mỗi thứ ba có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6 để khuếch đại đặc hiệu nhóm bao gồm 2 alen HLA-A*29:01 và HLA-A*31:01, trong đó mỗi trình tự này đều có nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp bổ sung với khuôn ADN của các alen HLA-A; và

- cặp mỗi thứ tư có trình tự nêu trong SEQ ID No.5 và SEQ ID No.7 để khuếch đại đặc hiệu alen HLA-A*33:03, trong đó mỗi trình tự này đều có vị trí nucleotit thứ 3 tính từ đầu 3' là nucleotit a mà không bắt cặp với ADN của các alen HLA-A.

Danh mục trình tự

<110>	Trường Đại học Dược Hà Nội	
<120>	Bộ mã đặc hiệu alen để phát hiện và phân biệt thể đồng hợp từ/dị hợp từ của alen <i>HLA-A*33:03</i>	
<160>	8	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mã	
<400>	1	
	cggcctctgt ggggagaagc a	21
<210>	2	
<211>	26	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mã	
<400>	2	
	gatattctag tgttggtccc aattgt	26
<210>	3	
<211>	21	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mã	
<400>	3	
	cccactccat gaggtattac t	21
<210>	4	
<211>	18	
<212>	Oligonucleotit	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mã	

<400> 4	
ctcggacccg gagactgt	18
<210> 5	
<211> 21	
<212> Oligonucleotit	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi	
<400> 5	
cccactccat gaggtattac a	21
<210> 6	
<211> 19	
<212> Oligonucleotit	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi	
<400> 6	
ggccttcaca ttccgtatc	19
<210> 7	
<211> 19	
<212> Oligonucleotit	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Đoạn mỗi	
<400> 7	
ggccttcaca ttccgtatg	19
<210> 8	
<211> 3518	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens.	
<300>	
<301> V.Albrecht et al	
<302> Dual redundant sequencing strategy: Full-length gene characterisation of 1056 novel and confirmatory HLA alleles.	
<303> HLA	

<304> 90

<305> 2

<306> 79-87

<307> 2017-05-25

<308> 28547825

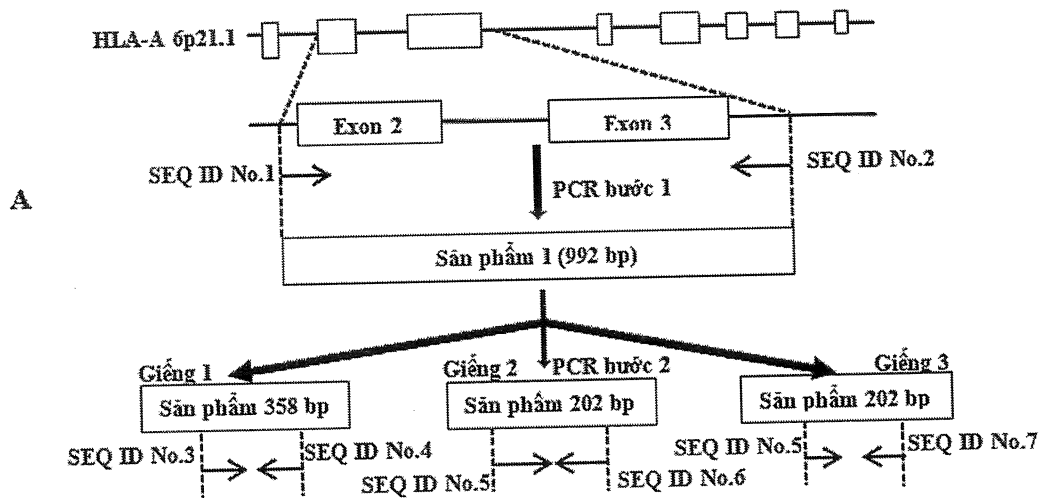
<309> 2018-11-30

<400> 8

caggagcaga	ggggtcaggg	cgaagtacca	gggccccagg	cgtggctctc	agggtctcag	60
gccccgaagg	cggtgtatgg	attggggagt	cccagccttg	gggattcccc	aactccgcag	120
tttcttttct	ccctctccca	acctatgtag	ggtccttctt	cctggatact	cacgacgcgg	180
accagtttct	cactcccatt	gggtgtcggg	tttccagaga	agccaatcag	tgtcgtcgcg	240
gtcgcgggtc	taaagtccgc	acgcaccac	cgggactcag	attctcccca	gacgccgagg	300
atggccgtca	tggcgccccg	aaccctctc	ctgctactct	tgggggccct	ggccctgacc	360
cagacctggg	cggttgagtg	cggggtcgtg	gggaaaccgc	ctctgcgggg	agaagcaagg	420
ggcccgcgcc	gcgggggcgc	aggaccgcgg	tagccgcgcc	gggaggaggg	tcgggcggat	480
ctcagccact	cctcgcccc	aggctccac	tccatgaggt	atttcaccac	atccgtgtcc	540
cgccccggcc	gcggggagcc	ccgcttcac	gccgtgggct	acgtggacga	cacgcagttc	600
gtgcggttcg	acagcgacgc	cgcgagccag	aggatggagc	cgcgggcgcc	gtggatagag	660
caggaggggc	cggagtattg	ggaccggaac	acacggaatg	tgaaggccca	ctcacagatt	720
gaccgagtgg	acctggggac	cctgcgcggc	tactacaacc	agagcgaggc	cggtgagtga	780
ccccagcccc	gggcgcaggt	cacgacctct	catccccac	ggacgggcca	ggtcacccac	840
agtctccggg	tccgagatcc	accccgaagc	cgcgggaccc	cgagaccctt	gccccgggag	900
aggcccaggc	gcctttaccc	ggtttcattt	tcagtttagg	ccaaaaatcc	ccccgggttg	960
gtcggggccg	gacggggctc	gggggactgg	gctgaccgtg	gggtcggggc	caggttctca	1020
caccatccag	atgatgtatg	gctgcgacgt	ggggtcggac	gggcgcttcc	tccgcgggta	1080
ccagcaggac	gcctacgacg	gcaaggatta	catcgccctg	aacgaggacc	tgcgctcttg	1140
gaccgcggcg	gacatggcgg	ctcagatcac	ccagcgcaag	tgggaggcgg	cccgtgtggc	1200
ggagcagttg	agagcctacc	tggagggcac	gtgcgtggag	tggctccgca	gatacctgga	1260
gaacgggaag	gagacgctgc	agcgcacggg	taccaggggc	cacggggcgc	ctccctgac	1320
gcctgtagat	ctcccgggct	ggcctccac	aaggagggga	gacaattggg	accaacacta	1380
gaatatcacc	ctccctctgg	tcctgaggga	gaggaatcct	cctgggtttc	cagatcctgt	1440
accagagagt	gactctgagg	ttccgccttg	ctctgtgaca	caattaaggg	ataaaatctc	1500
tgaagggaatg	acgggaagac	gatccctcga	atactgatga	gtggttcctt	ttgacacaca	1560
ccggcagcag	ccttgggccc	gtgacttttc	ctctcaggcc	ttgttctctg	cttcacactc	1620
aatgtgtgtg	gggtctctgag	tccagcactt	ctgagtcctt	cagcctccac	tcaggtcagg	1680
accagaagtc	gctgttccct	cttcaggggc	tagaattttc	cacggaatag	gagattatcc	1740
cagggtgcctg	tgtccaggct	gggtgtctggg	ttctgtgctc	ccttcccat	ccagggtgtc	1800
ctgtccattc	tcaagatagc	cacatgtgtg	ctggaggagt	gtcccattac	agatgcaaaa	1860
tgctgaatg	ttctgactct	tcctgacaga	ccccccaag	acgcatatga	ctcaccacgc	1920
tgtctctgac	catgaggcca	ccctgaggtg	ctgggccctg	agcttctacc	ctgcggagat	1980
cacactgacc	tggcagcggg	atggggagga	ccagaccacg	gacacggagc	tcgtggagac	2040

caggcctgca ggggatggaa ccttcagaa gtgggctct gtggtggtgc cttctggaca	2100
ggagcagaga tacacctgcc atgtgcagca tgagggcttc cccaagcccc tcacctgag	2160
atggggtaag gagggagatg ggggtgtcat gtcttttagg gaaagcagga gcctctctga	2220
ccttttagcag ggtcagggcc cctcaccttc cctctttttc ccagagcogt cttcccagcc	2280
caccatcccc atcgtgggca tcattgctgg cctagtcttc tttggagctg tgttcgctgg	2340
agctgtggtc gctgctgtga ggtggaggag gaagagctca ggtggggtga aggggtgaag	2400
ggtgggtctg agatttcttg tctcactgag ggttccaaga ccaggtaga agtgtgccct	2460
gcctcgttac tgggaagcac catccacaat tatgggccta ccagcctgg gccctgtgtg	2520
ccagcactta ctcttttgta aagcacctgt taaaatgaag gacagattta tcacctgat	2580
tatggcgggtg atgggacctg atcccagcag tcacaagtca cagggaagg tccctgagga	2640
ccttcaggag ggcggttggt ccaggacca cacctgcttt cttcatgttt cctgatcccg	2700
ccctgggtct gcagtcacac atttctggaa acttctctga ggtccaagac ttggaggttc	2760
ctctaggacc ttaaggccct ggctcctttc tggtatctca caggacattt tcttcccaca	2820
gatagaaaag gagggagcta ctctcaggct gcaagtaagt atgaaggagg atgatccaag	2880
aaatcactgg gatatttgtt ttgggagccc gtgggggagc tcaccacccc cacaattcct	2940
cctctagcca catcttctgt gggatctgac caggttctgt tttgtccta cccaggcag	3000
tgacagtgcc cagggtcttg atatgtctct cacagcttgt aaagggtgaga gcctggaggg	3060
cctgatgtgt gttgggtgtt gggcggaaca gtggacgcag ctgtgctatg gggtttcttt	3120
gcattggatg tattgagcat gcgatgggtt gtttaaagtg tgactcctca ctgtgacaga	3180
tacgaatttg ttcataaata tttttttcta tagtgtgaga cagctgcctt gtgtgggact	3240
gagaggcaag atttgttcct gcccttcctt ttgtgacttg aagtaccctg actttgtttc	3300
tgcaaaggca cctgcatgtg tctgtgttct tgtaggcata atgtgaggag gtggggagac	3360
cacccacccc ccatgtccac catgacctc tccccagct gacctgtgct ccctcccaa	3420
tcacttttcc tgttcagag aggtggggct gaggtgtctc catctctgcc tcaacttcat	3480
ggtgcactga gctgtaactt cttccttccc tattaata	3518

HÌNH 1



B

Kết quả điện di của các cặp mỗi bước 2			Kết luận
SEQ ID No.3 và SEQ ID No.4	SEQ ID No.5 và SEQ ID No.6	SEQ ID No.5 và SEQ ID No.7	
+	+	-	Âm tính với HLA-A*33:03
-	+	-	Âm tính với HLA-A*33:03
+	-	-	Âm tính với HLA-A*33:03
+	-	+	Dị hợp tử HLA-A*33:03
-	+	+	Dị hợp tử HLA-A*33:03
-	-	+	Đồng hợp tử HLA-A*33:03

HÌNH 2

A

SEQ ID No.1	5'-CGG CCTCTGTGGG GAGAAGCA-3'	400	410	420
gDNA	AGGGAAACCG	CCTCTGCGGG	GAGAAGCAAG	
A*01:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*02:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*02:03:01	-----G-----T-----C			
A*02:06:01:01	-----G-----T-----C			
A*02:07:01:01	-----G-----T-----C			
A*03:02:01:01	-----G-----T-----C			
A*11:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*11:02:01:01	-----G-----T-----C			
A*11:04	-----G-----T-----C			
A*24:02:01:01	-----G-----T-----C			
A*24:03:01:01	-----G-----T-----C			
A*24:07:01:01	-----G-----T-----C			
A*24:10:01:01	-----G-----T-----C			
A*26:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*29:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*30:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*31:01:02:01	-----G-----T-----C			
A*33:03:01:01	-----G-----T-----C			
A*34:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*68:01:01:01	-----G-----T-----C			
A*74:01:01:01	-----G-----T-----C			
C	-----G-----T-----A-----G-----G-----			
G	-----A-----C-----C-----G-----GG-----			

B

SEQ ID No.2	3'-TGTTAACC CTGGTTGTGA TCTTATAG-5'	1370	1380	1390
gDNA	AGACAATTGG	GACCAACACT	AGAATATAC	
A*01:01:01:01	-----G-----			
A*02:01:01:01	-----G-----			
A*02:03:01	-----G-----			
A*02:06:01:01	-----G-----			
A*02:07:01:01	-----G-----			
A*03:02:01:01	-----G-----			
A*11:01:01:01	-----G-----			
A*11:02:01:01	-----G-----			
A*11:04	-----G-----			
A*24:02:01:01	-----G-----			
A*24:03:01:01	-----G-----			
A*24:07:01:01	-----G-----			
A*24:10:01:01	-----G-----			
A*26:01:01:01	-----G-----			
A*29:01:01:01	-----G-----			
A*30:01:01:01	-----G-----			
A*31:01:02:01	-----G-----			
A*33:03:01:01	-----G-----			
A*34:01:01:01	-----G-----			
A*68:01:01:01	-----G-----			
A*74:01:01:01	-----G-----			
C	-----GA-----A-----T-----G-----G-----G-----			
G	-----GA-----A-----T-----G-----G-----G-----			

HÌNH 3

A					B				
SEQ ID No.3 5'-CCCA CTCCATGAGG TATTACT-3'					SEQ ID No.6 3'-CTATGCCTTA CACTTCCGG-5'				
SEQ ID No.5 5'-CCCA CTCCATGAGG TATTACA-3'					SEQ ID No.7 3'-GTATGCCTTA CACTTCCGG-5'				
gDNA					gDNA				
A*01:01:01:01 CAG GCTCCCA CTCCATGAGG TATTCTTCA					A*01:01:01:01 GGGACCAGGA GACACGGGAT ATGAAGGCCC				
A*02:01:01:01 --- ---T--- ---					A*02:01:01:01 ---GG--- ---A G---				
A*02:03:01 --- ---T--- ---					A*02:03:01 ---GG--- ---A G---				
A*02:06:01:01 --- ---T--- ---A-					A*02:06:01:01 ---GG--- ---A G---				
A*02:07:01:01 --- ---T--- ---					A*02:07:01:01 ---GG--- ---A G---				
A*03:02:01:01 --- --- ---					A*03:02:01:01 --- --- ---G---				
A*11:01:01:01 --- --- ---A-					A*11:01:01:01 --- --- ---G---				
A*11:02:01:01 --- --- ---A-					A*11:02:01:01 --- --- ---G---				
A*11:04 --- --- ---A-					A*11:04 --- --- ---G---				
A*24:02:01:01 --- --- ---C-					A*24:02:01:01 ---G--- ---G-A G---				
A*24:03:01:01 --- --- ---C-					A*24:03:01:01 ---G--- ---G-A G---				
A*24:07:01:01 --- --- ---C-					A*24:07:01:01 ---G--- ---G-A G---				
A*24:10:01:01 --- --- ---C-					A*24:10:01:01 ---G--- ---G-A G---				
A*26:01:01:01 --- --- ---A-					A*26:01:01:01 ---G-A C--- ---G---				
A*29:01:01:01 --- --- ---AC					A*29:01:01:01 ---T-C--- ---G---				
A*30:01:01:01 --- --- ---C-					A*30:01:01:01 --- --- ---G---				
A*31:01:02:01 --- --- ---AC					A*31:01:02:01 --- --- ---G---				
A*33:03:01:01 --- --- ---AC					A*33:03:01:01 ---G-A C--- ---G---				
A*34:01:01:01 --- --- ---A-					A*34:01:01:01 ---G-A C--- ---A G---				
A*68:01:01:01 --- --- ---A-					A*68:01:01:01 ---G-A C--- ---G---				
A*74:01:01:01 --- --- ---					A*74:01:01:01 --- --- ---G---				

HÌNH 4

