



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

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

(11)



1-0043302

(51)^{2020.01} C12Q 1/686

(13) B

(21) 1-2021-04516

(22) 22/01/2020

(86) PCT/KR2020/001123 22/01/2020

(87) WO2020/153764 30/07/2020

(30) 10-2019-0009061 24/01/2019 KR

(45) 25/02/2025 443

(43) 27/12/2021 405

(73) SEASUN BIOMATERIALS (KR)

N504, N513, N515-518 11-3, Techno 1-ro Yuseong-gu Daejeon 34015 (KR)

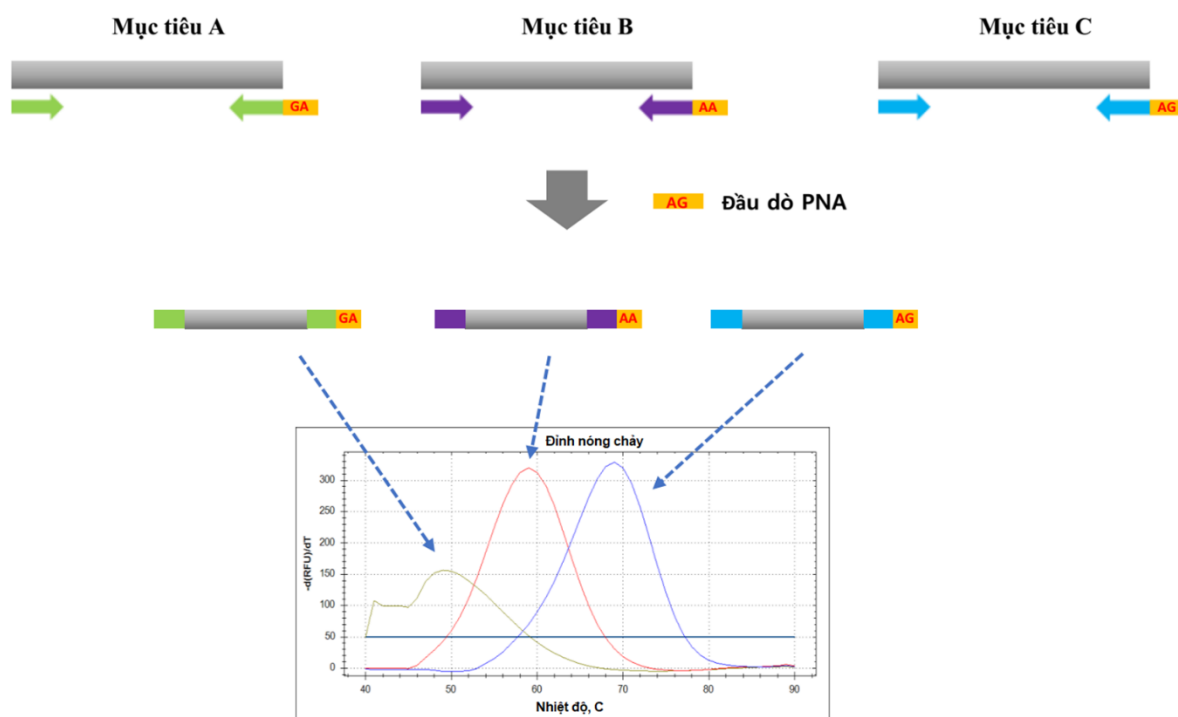
(72) LEE, Si Seok (KR); YANG, Eun Ju (KR); KIM, Kyung Tak (KR); JEON, Mee-Hyang (KR); PARK, Hee Kyung (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐA MỤC TIÊU DỰA TRÊN MỘT MẪU DÒ PHÁT HIỆN DUY NHẤT SỬ DỤNG TRÌNH TỰ THỂ SNP VÀ HỢP PHẦN PCR ĐỂ PHÁT HIỆN ĐA MỤC TIÊU

(21) 1-2021-04516

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đa mục tiêu dựa trên một mẫu dò phát hiện duy nhất và cụ thể hơn đề cập đến phương pháp phát hiện đa mục tiêu bằng cách khuếch đại từng mục tiêu bằng các đoạn môi bao gồm trình tự thể chứa SNP, lai các sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò phát hiện duy nhất có khả năng liên kết với các trình tự thể và được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy là khác nhau và phân tích các đường cong nóng chảy. Phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế cho phép phát hiện đa mục tiêu bằng cách sử dụng một mẫu dò duy nhất, và do đó rất hữu ích để phát hiện đa mục tiêu vì khả năng dương tính giả được giảm và đa mục tiêu có thể phát hiện được với độ nhạy cao và tốc độ nhanh.



HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đa mục tiêu dựa trên một mẫu dò phát hiện duy nhất và cụ thể là phương pháp phát hiện đa mục tiêu bằng cách khuếch đại từng mục tiêu bằng các đoạn mồi bao gồm trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của các sản phẩm phản ứng lai của các sản phẩm khuếch đại và mẫu dò phát hiện là khác nhau, và sau đó lai các sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò phát hiện duy nhất liên kết với tất cả các trình tự thể và phân tích các đường cong nóng chảy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lĩnh vực chẩn đoán các axit nucleic cụ thể được sử dụng để phân biệt các đa hình nucleotit đơn (single-nucleotide polymorphism - SNP), phát hiện và xác định vi khuẩn hoặc virus gây bệnh và chẩn đoán các bệnh di truyền. Do đó, nhiều phương pháp để phát hiện nhanh chóng và chính xác các axit nucleic cụ thể đã được đề xuất và nhiều nghiên cứu liên quan hiện đang được tiến hành (W. Shen và cộng sự, 2013, Biosen. và Bioele., 42:165-172; M.L. Ermini và cộng sự, 2014, Biosen. và Bioele., 61:28-37.; K. Chang và cộng sự, 2015, Biosen. và Bioele., 66:297-307.).

Cụ thể, phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để phát hiện axit nucleic cụ thể bao gồm phương pháp sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) và phương pháp sử dụng PCR thời gian thực và phản ứng chuỗi polymeraza đa mồi (PCR đa mồi).

PCR có ưu điểm là có thể liên kết với ADN khuôn và chỉ cho phép khuếch đại chính xác vùng đích của gen cần phát hiện thông qua thiết kế đoạn mồi hoặc mẫu dò mà vật liệu huỳnh quang và chất dập tắt được liên kết với nhau. Tuy nhiên, chỉ một

axit nucleic có thể được khuếch đại trong một phản ứng và do đó, khi số lượng axit nucleic cần khuếch đại lớn, thì thao tác tương tự phải được lặp lại, điều này rất công kềnh.

PCR thời gian thực đo các sản phẩm khuếch đại theo thời gian thực, giảm nhiễu chéo và cho phép phân tích định lượng chính xác hơn. Như các tài liệu sáng chế thông thường liên quan đến PCR thời gian thực, có patent Mỹ số 5,210,015, 5,538,848, và 6,326,145.

Các phương pháp PCR thời gian thực hiện tại có ưu điểm là phương pháp xét nghiệm đồng nhất trong đó khuếch đại và phát hiện được thực hiện đồng thời, nhưng có vấn đề đa dạng là số lượng trình tự axit nucleic mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời bị hạn chế do hạn chế ở loại phân tử phóng huỳnh quang, đây là trở ngại lớn nhất để thu được thông lượng cao. Các máy chu trình nhiệt hiện có có khả năng phát hiện trình tự axit nucleic mục tiêu trong thời gian thực cho phép phát hiện đồng thời tối đa 5 thành phần, và do đó số lượng trình tự axit nucleic mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời bị hạn chế, và cần nhiều thời gian và thiết bị theo dõi thời gian thực đắt tiền bổ sung để phân tích mẫu có khối lượng lớn.

Phương pháp mẫu dò TaqMan (patent Mỹ số 5,210,015) và phương pháp mẫu dò huỳnh quang tự dập tắt (patent Mỹ số 5,723,591), là các phương pháp PCR thời gian thực đại diện, có vấn đề là xảy ra dương tính giả do liên kết không đặc hiệu của mẫu dò được đánh dấu kép, và do đó, thực tế rất khó để thực hiện phản ứng 5 thành phần, và các kỹ năng và bí quyết chuyên biệt là nhất thiết phải có. Vì phương pháp PCR thời gian thực thông thường thực hiện đồng thời khuếch đại và phát hiện, nên có hạn chế về thông lượng cao của thiết bị PCR thời gian thực.

PCR đa môi có ưu điểm là một số phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện trong một ống duy nhất, do đó phân tích đồng thời nhiều axit nucleic. Tuy nhiên, vì nhiều đoạn môi hoặc mẫu dò được sử dụng đồng thời trong một ống, xảy ra phản ứng chéo giữa các mẫu dò và các đoạn môi hoặc giữa các đoạn môi, do đó số lượng axit

nucleic có thể được khuếch đại cùng một lúc là hạn chế, cần nhiều nỗ lực và thời gian để xác định các điều kiện phản ứng, và không thể thu được kết quả tốt về độ nhạy và tính đặc hiệu (Hardenbol và cộng sự, 2003, Nat. Biotechnol., 21:673.).

Ngoài ra, vì một axit nucleic cần phát hiện có thể được đánh dấu chỉ bằng một vật liệu huỳnh quang và thiết bị hiện được sử dụng để phát hiện vật liệu huỳnh quang có hạn chế là số lượng kênh huỳnh quang có thể được phân tích đồng thời tại một thời điểm được giới hạn ở 4 loại đến 7 loại, có vấn đề là phải lặp lại hai hoặc nhiều thao tác giống hệt nhau để phân tích 8 axit nucleic trở lên.

Do đó, các nghiên cứu gần đây đã được tiến hành tích cực để cho phép phân tích lượng lớn bằng cách khuếch đại đồng thời nhiều axit nucleic bằng cách sử dụng các đoạn mồi chung mà không sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza đa mồi. Các công nghệ đại diện bao gồm SNPlex, xét nghiệm Goldengate, mẫu dò đảo ngược phân tử (molecular inversion probe - MIP), và những công nghệ tương tự.

SNPlex là phương pháp liên quan đến việc thực hiện quy trình tinh chế bằng cách sử dụng exonucleaza sau thử nghiệm gắn oligonucleotit (oligonucleotide ligation assay - OLA) và thực hiện khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza với các trình tự bazơ đoạn mồi chung có ở các đầu đối diện của mẫu dò, và cuối cùng thực hiện phân tích trong chip ADN bằng cách sử dụng trình tự bazơ ZipCode có trong mẫu dò (Tobler và cộng sự, J. Biomol. Tech., 16:398, 2005).

Xét nghiệm Goldengate là phương pháp trong đó phản ứng kéo dài đoạn mồi đặc hiệu alen được thực hiện trên ADN bộ gen được cố định trên bề mặt rắn bằng cách sử dụng mẫu dò ngược dòng, sau đó ADN được gắn với mẫu dò xuôi dòng và rửa để loại bỏ các mẫu dò không được gắn vào ADN, ADN được khuếch đại bằng cách sử dụng trình tự nucleotit đoạn mồi chung có trong các mẫu dò, như trường hợp SNPlex, và các sản phẩm PCR khuếch đại được phân tích bằng Illumina BeadChip (Shen và cộng sự, Mutat. Res., 573:70, 2005).

Mẫu dò đảo ngược phân tử (MIP) là phương pháp trong đó việc gắn có khoảng hở được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu dò khóa móc, sau đó các mẫu dò và ADN bộ gen không được gắn với ADN sẽ được loại bỏ bằng cách sử dụng exonucleaza và mẫu dò khóa móc được chuyển thành mạch thẳng bằng cách sử dụng uraxin-N-glycosylaza, tiếp theo là phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng trình tự nucleotit đoạn môi chung có trong các mẫu dò và lai với mảng thẻ GenFlex (Affymetrix) để phân tích các vùng gen khác nhau (Hardenbol và cộng sự, Nat. Biotechnol., 21:673,2003).

Tuy nhiên, các phương pháp này có vấn đề ở chỗ, vì các phản sản phẩm phản ứng trong ống thứ nhất được chuyển và phản ứng trong ống thứ hai hoặc phải sử dụng một số loại enzym nên có thể xảy ra hiện tượng nhiễm chéo giữa các mẫu và phương pháp thí nghiệm rất phức tạp.

Do đó, kết quả của những nỗ lực chuyên sâu để giải quyết các vấn đề được mô tả ở trên và phát triển phương pháp phát hiện đa mục tiêu bằng cách sử dụng một mẫu dò duy nhất, các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng, khi khuếch đại đa mục tiêu bằng các đoạn môi bao gồm trình tự thẻ được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của các sản phẩm lai của sản phẩm khuếch đại và mẫu dò phát hiện là khác nhau, lai các mục tiêu với một mẫu dò phát hiện duy nhất liên kết với tất cả các trình tự thẻ, và sau đó phân tích các đường cong nóng chảy, có thể phát hiện đa mục tiêu với độ nhạy cao và độ chính xác cao, do đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế được tạo ra để giải quyết các vấn đề trên, và mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện đa mục tiêu.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hợp phần PCR để phát hiện đa mục tiêu.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân tích mức độ biểu

hiện của nhiều gen mục tiêu.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các mục đích trên và các mục đích khác có thể được thực hiện bằng cách đề xuất phương pháp phát hiện đa mục tiêu, phương pháp này bao gồm: a) thu ADN từ mẫu chứa đa mục tiêu; b) khuếch đại nhiều axit nucleic mục tiêu bằng cách sử dụng n bộ môi có khả năng khuếch đại tương ứng n nhiều axit nucleic mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20); c) lai n sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò phát hiện duy nhất có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại; và d) phân tích đường cong nóng chảy của từng sản phẩm trong số n sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c) để xác định sự có mặt hay không có mặt của các axit nucleic mục tiêu, trong đó mỗi trong số n bộ môi bao gồm đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược bao gồm trình tự thể, trong đó các trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai là khác nhau.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất hợp phần PCR để phát hiện đa mục tiêu, hợp phần PCR này bao gồm: i) n bộ môi có khả năng khuếch đại n mục tiêu tương ứng; và ii) mẫu dò phát hiện có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại được khuếch đại bằng n bộ môi (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20), trong đó mỗi bộ trong số n bộ môi bao gồm đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược bao gồm trình tự thể, trong đó trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai là khác nhau.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của nhiều gen mục tiêu, bao gồm: a) thu được thư viện cADN từ mẫu chứa đa mục tiêu; b) khuếch đại gen tham chiếu và các gen mục tiêu bằng bộ môi có khả năng khuếch đại gen tham chiếu và n bộ môi có khả năng khuếch đại tương ứng n gen mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20); c) lai các sản phẩm khuếch đại với mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả các sản phẩm khuếch đại của gen tham chiếu và n sản phẩm khuếch đại; d) phân tích đường cong nóng chảy của các sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c); và e) so sánh và phân tích các

giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời và ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được, trong đó mỗi trong số n bộ môi bao gồm đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược bao gồm trình tự thể, trong đó các trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích nêu trên và các mục đích khác, các đặc tính và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết sau đây được thực hiện cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là hình chiếu minh họa khái niệm về phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 2 minh họa các điều kiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) thời gian thực để phát hiện virus và vi khuẩn liên quan đến viêm màng não bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 3 minh họa kết quả phát hiện đồng thời virus và vi khuẩn viêm màng não bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 4 là hình chiếu minh họa các điều kiện PCR thời gian thực để xác định giá trị Tm nhằm phân tích mức độ biểu hiện của gen mục tiêu so với gen tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 5 minh họa kết quả phân tích giá trị Ct theo nhiệt độ để xác nhận mức độ biểu hiện của gen mục tiêu so với gen tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 6 là hình chiếu minh họa các điều kiện PCR thời gian thực để phân tích mức độ biểu hiện của gen mục tiêu so với gen tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế;

Hình 7 minh họa kết quả phân tích mức độ biểu hiện của gen mục tiêu thứ nhất so với gen tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế; và

Hình 8 minh họa kết quả phân tích mức độ biểu hiện của gen mục tiêu thứ hai so với gen tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến. Nói chung, thuật ngữ được sử dụng ở đây và các phương pháp thực nghiệm được mô tả dưới đây đều đã được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Sáng chế nhằm khẳng định rằng, khi khuếch đại các mục tiêu bằng bộ mỗi bao gồm các trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của các sản phẩm phản ứng lai của các sản phẩm khuếch đại và mẫu dò phát hiện là khác nhau, lai các sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò duy nhất liên kết với tất cả các trình tự thể, và sau đó phân tích các đường cong nóng chảy, có thể phát hiện đa mục tiêu bằng cách sử dụng một mẫu dò duy nhất.

Cụ thể, theo một phương án của sáng chế, khi bộ mỗi tương ứng có khả năng khuếch đại 6 loại virus gây bệnh viêm màng não (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV và HHV-6) và 5 loại vi khuẩn gây bệnh viêm màng não (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Listeria monocytogenes*, *Liên cầu khuẩn nhóm B* và *Neisseria meningitidis*) được hợp nhất với các trình tự thể khác nhau cho từng loại virus và vi khuẩn, sau đó sản phẩm khuếch đại được tạo ra và lai với mẫu dò phát hiện thứ nhất, có khả năng liên kết với tất cả các trình tự thể của 6 loại virus và mẫu dò phát hiện thứ hai, có khả năng liên kết với tất cả các trình tự thể của 5 loại vi

khuẩn, sau đó các đường cong nóng chảy được phân tích, đã khẳng định rằng từng loại virus và vi khuẩn có thể được phát hiện với độ nhạy cao (xem các hình từ Hình 1 đến Hình 3).

Do đó, một phương án của sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện đa mục tiêu, bao gồm:

- a) thu ADN từ mẫu chứa đa mục tiêu;
 - b) khuếch đại nhiều axit nucleic mục tiêu bằng cách sử dụng n bộ mỗi có khả năng khuếch đại tương ứng n nhiều axit nucleic mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20);
 - c) lai n sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò phát hiện duy nhất có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại; và
 - d) phân tích đường cong nóng chảy của từng sản phẩm trong số n sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c) để xác định sự có mặt hay không có mặt của axit nucleic mục tiêu,
- trong đó mỗi bộ trong số n bộ mỗi bao gồm
- đoạn mỗi xuôi và đoạn mỗi ngược bao gồm trình tự thể, và
- trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai là khác nhau.

Thuật ngữ “mục tiêu” như được sử dụng ở đây có nghĩa là tất cả các loại axit nucleic cần phát hiện và bao gồm trình tự nucleotit của nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ các loài, dưới loài hoặc biến thể khác nhau và đột biến nhiễm sắc thể trong cùng một loài. Mục tiêu có thể bao gồm tất cả các loại ADN bao gồm ADN bộ gen, ADN ty thể và ADN virus, hoặc tất cả các loại ARN bao gồm mRNA, miRNA, ARN ribosom, ARN không mã hóa, tARN và ARN virus, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các mục tiêu này.

Theo sáng chế, mục tiêu có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự nucleotit đột biến bao gồm đột biến trong trình tự nucleotit và đột biến có thể được chọn từ nhóm bao gồm đa hình nucleotit đơn (single-nucleotide polymorphism - SNP), đột biến chèn đoạn, đột biến mất đoạn, đột biến điểm, đột biến dung hợp, chuyển vị, đảo đoạn và mất dị hợp tử (loss of heterozygosity - LOH), nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, mục tiêu có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit nucleic có khả năng phát hiện loại vi khuẩn hoặc virus cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nucleosit” chỉ hợp chất glycosylamin trong đó bazơ của axit nucleic (nucleobazơ) được liên kết với nhóm đường. “Nucleotit” có nghĩa là nucleosit phosphat. Như được thể hiện trong Bảng 1, các nucleotit có thể được biểu thị bằng các chữ cái trong bảng chữ cái (tên chữ cái) tương ứng với các nucleosit của chúng. Ví dụ: A chỉ adenosin (nucleosit chứa adenin nucleobazơ), C chỉ xytydin, G chỉ guanosin, U chỉ uridin, và T chỉ thymidin (5-metyl uridin). W chỉ A hoặc T/U, và S chỉ G hoặc C. N biểu thị nucleosit ngẫu nhiên và dNTP có nghĩa là deoxyribonucleosit triphosphat. N có thể là bất kỳ trong số A, C, G hoặc T/U.

Bảng 1

Chữ cái trong bảng chữ cái	Nucleotit được biểu thị bằng chữ cái trong bảng chữ cái
G	G
A	A
T	T
C	C
U	U

R	G hoặc A
Y	T/U hoặc C
M	A hoặc C
K	G hoặc T/U
S	G hoặc C
W	A hoặc T/U
H	A hoặc C hoặc T/U
B	G hoặc T/U hoặc C
V	G hoặc C hoặc A
D	G hoặc A hoặc T/U
N	G hoặc A hoặc T/U hoặc C

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “oligonucleotit” chỉ oligome của nucleotit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit nucleic” chỉ polyme của các nucleotit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự” chỉ trình tự nucleotit của oligonucleotit hoặc axit nucleic. Trong toàn bộ bản mô tả sáng chế, bất cứ khi nào oligonucleotit hoặc axit nucleic được biểu thị bằng trình tự các chữ cái, các nucleotit theo thứ tự 5'→ từ trái sang phải. Oligonucleotit hoặc axit nucleic có thể là ADN, ARN hoặc các chất tương tự của chúng (ví dụ, chất tương tự phosphorothioat). Oligonucleotit hoặc axit nucleic cũng có thể bao gồm các bazơ và/hoặc liên kết khung đã được biến đổi (ví dụ, các liên kết phosphat biến đổi hoặc các nhóm đường biến đổi). Các ví dụ không giới hạn về liên kết khung tổng hợp mang lại sự ổn định và/hoặc các ưu điểm khác cho axit nucleic có thể bao gồm liên kết phosphorothioat, axit nucleic peptit, axit nucleic bị khóa, axit nucleic xyloza, hoặc các chất tương tự của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit nucleic” chỉ polyme của nucleotit và bao gồm các chất tương tự đã biết của nucleotit tự nhiên có thể hoạt động theo cách tương tự như nucleotit tự nhiên (ví dụ, lai) trừ khi được định nghĩa khác.

Thuật ngữ “axit nucleic” bao gồm dạng bất kỳ của ADN hoặc ARN bao gồm, ví dụ, ADN bộ gen, ADN bổ sung (cADN), là đại diện ADN của mARN, thường thu được bằng cách phiên mã ngược hoặc khuếch đại ARN thông tin (mARN), các phân tử ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc bằng cách khuếch đại, và mARN.

Thuật ngữ “axit nucleic” bao gồm các axit nucleic sợi kép hoặc sợi ba cũng như các phân tử sợi đơn. Trong axit nucleic sợi kép hoặc sợi ba, các sợi axit nucleic không cần phải cùng phạm vi (nghĩa là, các axit nucleic sợi kép không cần phải là sợi kép dọc theo chiều dài đầy đủ của cả hai sợi).

Thuật ngữ “axit nucleic” cũng bao gồm biến đổi hóa học bất kỳ của chúng, như bằng cách metyl hóa và/hoặc bằng cách tạo mũ. Các biến đổi axit nucleic có thể bao gồm bổ sung các nhóm hóa học mang lại điện tích bổ sung, tính phân cực, liên kết hydro, tương tác tĩnh điện hoặc chức năng khác đối với các bazơ của axit nucleic riêng lẻ hoặc cho toàn bộ axit nucleic. Những biến đổi như vậy có thể bao gồm những biến đổi bazơ như biến đổi đường vị trí 2', biến đổi pyrimidin vị trí 5, biến đổi purin vị trí 8, biến đổi ở các amin ngoại vòng xytosin, thay thế 5-bromo-uraxin, biến đổi liên kết khung và kết hợp bất cặp bazơ bất thường như các isobazơ isoxytidin và isoguanidin.

Các axit nucleic có thể được tạo ra thông qua quy trình tổng hợp hóa học hoàn chỉnh, như tổng hợp hóa học qua trung gian pha rắn, từ nguồn sinh học, như phân lập từ loài bất kỳ tạo ra axit nucleic, từ các quy trình liên quan đến việc xử lý axit nucleic bằng các công cụ sinh học phân tử, như sao chép ADN, khuếch đại bằng PCR và phiên mã ngược, hoặc từ sự kết hợp của các quy trình này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bổ sung” chỉ khả năng bắt cặp chính xác giữa hai nucleotit. Nghĩa là, nếu nucleotit tại một vị trí nhất định của axit nucleic có khả năng tạo liên kết hydro với nucleotit của một axit nucleic khác thì hai axit nucleic được coi là bổ sung với nhau tại vị trí đó. Sự bổ sung giữa hai phân tử axit nucleic sợi đơn có thể là “một phần”, trong đó chỉ một số nucleotit liên kết hoặc có thể hoàn toàn khi tồn tại sự bổ sung toàn bộ giữa các phân tử sợi đơn. Mức độ bổ sung giữa các sợi axit nucleic có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả và độ bền của việc lai giữa các sợi axit nucleic.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đoạn mồi” chỉ oligonucleotit mạch thẳng ngắn lai với trình tự axit nucleic mục tiêu (ví dụ: khuôn ADN cần khuếch đại) để lập trình phản ứng tổng hợp axit nucleic. Đoạn mồi có thể là oligonucleotit ARN, oligonucleotit ADN, hoặc trình tự khảm. Đoạn mồi có thể bao gồm nucleotit tự nhiên, tổng hợp hoặc biến đổi. Cả giới hạn trên và giới hạn dưới của chiều dài đoạn mồi đều được xác định bằng thực nghiệm. Giới hạn dưới về độ dài đoạn mồi là độ dài tối thiểu cần thiết để tạo thành sợi kép ổn định khi lai với axit nucleic mục tiêu trong điều kiện phản ứng khuếch đại axit nucleic. Các đoạn mồi rất ngắn (thường dài ít hơn 3 nucleotit) không tạo thành các sợi kép ổn định về mặt nhiệt động học với các axit nucleic đích trong các điều kiện lai như vậy. Giới hạn trên nói chung được xác định bởi khả năng tạo thành sợi kép ở vùng khác với trình tự axit nucleic đã xác định trước. Nói chung, chiều dài của đoạn mồi thích hợp có thể dao động từ khoảng 3 nucleotit đến khoảng 50 nucleotit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mẫu dò” chỉ axit nucleic có khả năng liên kết với axit nucleic mục tiêu có trình tự bổ sung thông qua một hoặc nhiều loại liên kết hóa học, nói chung là thông qua sự ghép cặp bazơ bổ sung, thường là thông qua sự tạo thành liên kết hydro, do đó tạo ra cấu trúc sợi kép. Các mẫu dò liên kết hoặc lai với “các vị trí gắn kết với mẫu dò”. Cụ thể, khi mẫu dò lai với mục tiêu bổ sung với mẫu dò, mẫu dò có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được để

tạo thuận lợi cho việc phát hiện mẫu dò. Tuy nhiên, theo cách khác, mẫu dò có thể không được đánh dấu, nhưng có thể được phát hiện bằng cách liên kết đặc hiệu với phối tử được đánh dấu, trực tiếp hoặc gián tiếp. Mẫu dò có thể thay đổi kích thước đáng kể. Các mẫu dò thường có chiều dài ít nhất là từ 7 đến 18 nucleotit. Các mẫu dò khác có chiều dài ít nhất là 20, 30 hoặc 40 nucleotit. Vẫn còn những mẫu dò khác dài hơn một chút và có độ dài ít nhất là 50, 60, 70, 80 hoặc 90 nucleotit. Tuy nhiên, các mẫu dò khác dài hơn nhiều và có độ dài ít nhất 100, 150, 200 hoặc nhiều hơn 200 nucleotit. Các mẫu dò cũng có thể có chiều dài trong phạm vi bất kỳ được giới hạn bởi giá trị bất kỳ trong số các giá trị nêu trên (ví dụ, chiều dài 15 đến 20 nucleotit).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lai” chỉ sự tạo thành axit nucleic sợi đôi bằng liên kết hydro giữa các axit nucleic sợi đơn có trình tự nucleotit bổ sung và được sử dụng thay thế cho nhau với thuật ngữ “gắn”. Theo nghĩa rộng hơn một chút, lai không chỉ bao gồm trường hợp trong đó trình tự nucleotit giữa hai sợi đơn bổ sung hoàn toàn (bắt cặp hoàn hảo), mà còn đặc biệt bao gồm trường hợp trong đó một số trình tự nucleotit không bổ sung (bắt cặp sai).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mẫu” chỉ hợp phần có chứa hoặc được cho là có chứa mục tiêu và cần phân tích, và có thể là mẫu được thu thập từ bất kỳ một hoặc nhiều nguồn được chọn lọc từ chất lỏng, đất, không khí, thực phẩm, chất thải, các chất có nguồn gốc từ người, ruột động vật, mô động vật và thực vật, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Về vấn đề này, chất lỏng có thể là nước, máu, nước tiểu, nước mắt, mồ hôi, nước bọt, bạch huyết, dịch não tủy và những thứ tương tự, nước bao gồm nước sông, nước biển, nước hồ, nước mưa, và những thứ tương tự, chất thải bao gồm nước cống, nước thải và những thứ tương tự, và các mô động vật và thực vật bao gồm cả mô của người. Ngoài ra, mô động vật và thực vật bao gồm các mô như màng nhầy, da, vỏ não, lông, vảy, mắt, lưỡi, má, móng guốc, mỏ, mõm, bàn chân, bàn tay, miệng, núm vú, tai và mũi.

Tốt hơn là, mẫu theo sáng chế có thể là mẫu sinh học cần phân tích bằng phương pháp theo sáng chế. Tốt hơn nữa, mẫu có thể là mẫu trộn với các loài virus hoặc mẫu của cá thể (ví dụ, người, động vật có vú và cá) bị nhiễm virus, và mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật, động vật, người, nấm, vi khuẩn và virus có thể được phân tích. Khi mẫu có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc người được phân tích, mẫu có thể được thu từ mô hoặc cơ quan cụ thể. Các ví dụ đại diện về mô bao gồm mô liên kết, da, cơ hoặc mô thần kinh. Ví dụ đại diện cho các cơ quan bao gồm mắt, não, phổi, gan, lá lách, tủy xương, tuyến ức, tim, bạch huyết, máu, xương, sụn, tuyến tụy, thận, túi mật, dạ dày, ruột non, tinh hoàn, buồng trứng, tử cung, trực tràng, hệ thần kinh, các tuyến và mạch máu bên trong. Mẫu sinh học cần phân tích bao gồm tế bào, mô hoặc chất lỏng bất kỳ có nguồn gốc sinh học hoặc môi trường bất kỳ khác có thể được phân tích theo sáng chế, và bao gồm các mẫu từ người, động vật hoặc thực phẩm được chế biến để người hoặc động vật tiêu thụ. Ngoài ra, mẫu sinh học cần phân tích bao gồm các mẫu dịch cơ thể và các ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, huyết thanh, huyết tương, bạch huyết, sữa mẹ, nước tiểu, phân, dịch mắt, nước bọt, tinh dịch, chất chiết xuất từ não (ví dụ: mẫu não bộ), dịch tủy sống, ruột thừa, lá lách và chất chiết xuất từ mô amidan.

Theo sáng chế, quy trình khuếch đại có thể được thực hiện thông qua bất kỳ loại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) nào, nhưng tốt hơn là có thể sử dụng PCR bất đối xứng.

Theo sáng chế, trình tự thể có thể có độ dài từ 5 bp đến 50 bp.

Theo sáng chế, trình tự thể có thể có tỷ lệ GC từ 20% đến 80%.

Theo sáng chế, nhiệt độ nóng chảy của trình tự thể có thể được điều chỉnh theo thành phần hoặc độ dài của trình tự thể.

Theo sáng chế, trình tự thể có thể bổ sung với trình tự mẫu dò hoặc trình tự chứa trình tự mẫu dò.

Theo sáng chế, sự khác biệt giữa các nhiệt độ nóng chảy không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó có thể phân biệt được trên đồ thị phân tích, nhưng tốt hơn là có thể nằm trong khoảng từ 2°C đến 40°C, tốt hơn là từ 5°C đến 30°C, và tốt hơn là 8°C đến 20°C.

Theo sáng chế, trong quy trình b), p bộ mỗi có khả năng phát hiện p mục tiêu tương ứng có thể được đưa vào thêm (trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20), và

trong quy trình c), mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả p sản phẩm khuếch đại có thể được đưa vào thêm.

Theo sáng chế, mẫu dò phát hiện có thể là oligonucleotit, axit nucleic peptit (PNA) hoặc axit nucleic bị khóa (LNA), và có thể có chất chỉ thị (reporter) và chất dập tắt được gắn vào các đầu đối diện của chúng.

Theo sáng chế, axit nucleic peptit (PNA) là chất nhận biết gen, như axit nucleic bị khóa (LNA) hoặc axit nucleic morpholino (MNA), được tổng hợp nhân tạo và có liên kết khung bao gồm polyamit. PNA rất tốt về ái lực và tính chọn lọc, đồng thời có tính ổn định cao đối với các enzym phân giải nucleotit, và do đó không bị phân cắt bởi các enzym giới hạn hiện có. Ngoài ra, PNA có tính chất nhiệt/hóa học và độ ổn định tuyệt vời, do đó việc lưu trữ chúng rất dễ dàng và PNA không dễ bị phân hủy. Ngoài ra, ái lực liên kết PNA-ADN cao hơn nhiều so với ái lực liên kết ADN-ADN, và do đó có sự khác biệt về nhiệt độ nóng chảy (T_m) trong khoảng 10°C đến 15°C ngay cả khi có sự bắt cặp sai một nucleotit. Sử dụng sự khác biệt này về ái lực liên kết, các đa hình nucleotit đơn (SNP) và các thay đổi nucleotit chèn/mất (InDel) có thể được phát hiện.

Giá trị T_m cũng thay đổi tùy thuộc vào sự khác biệt giữa axit nucleic của mẫu dò PNA và ADN liên kết bổ sung với nó, và do đó, việc phát triển các kỹ thuật ứng dụng sử dụng mẫu dò PNA là dễ dàng. Mẫu dò PNA được phân tích bằng phản ứng

lai khác với phản ứng thủy phân của mẫu dò TaqMan và các mẫu dò có chức năng tương tự như của mẫu dò PNA bao gồm mẫu dò đèn hiệu phân tử và mẫu dò bộ cặp.

Theo sáng chế, mẫu dò PNA không bị giới hạn, nhưng có thể có chất chỉ thị hoặc chất dập tắt bị liên kết với nó. Mẫu dò PNA theo sáng chế, bao gồm chất chỉ thị và chất dập tắt tạo ra tín hiệu huỳnh quang sau khi lai với axit nucleic mục tiêu và khi nhiệt độ tăng lên, mẫu dò PNA được làm tan chảy nhanh chóng với axit nucleic mục tiêu ở nhiệt độ nóng chảy thích hợp của nó, và do đó tín hiệu huỳnh quang bị dập tắt. Thông qua phân tích đường cong nóng chảy có độ phân giải cao thu được từ tín hiệu huỳnh quang theo sự thay đổi nhiệt độ, có thể phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt axit nucleic mục tiêu.

Vật liệu huỳnh quang có thể liên kết với mẫu dò theo sáng chế, bao gồm, ở các đầu đối diện của nó, chất chỉ thị và chất dập tắt có khả năng dập tắt huỳnh quang của chất chỉ thị, và có thể bao gồm vật liệu huỳnh quang xen kẽ. Chất chỉ thị có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 6-cacboxyfluorescein (FAM), HEX, Texas Red, JOE, TAMRA, CY5, CY3 và Alexa680, và là chất dập tắt, 6-cacboxytetrametyl-rhodamin (TAMRA), BHQ1, BHQ2 hoặc Dabcyl được sử dụng là tốt hơn, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Vật liệu huỳnh quang xen kẽ có thể được chọn từ nhóm bao gồm acridin homodime và các dẫn xuất của chúng, acridin da cam và các dẫn xuất của chúng, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) và các dẫn xuất của chúng, actinomycin D và các dẫn xuất của chúng, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridin (ACMA) và các dẫn xuất của chúng, DAPI và các dẫn xuất của chúng, dihydroetidium và các dẫn xuất của chúng, etidium bromua và các dẫn xuất của chúng, etidium homodime-1 (EthD-1) và các dẫn xuất của chúng, etidium homodime-2 (EthD-2) và các dẫn xuất của chúng, etidium monoazit và các dẫn xuất của chúng, hexidium iodit và các dẫn xuất của chúng, bisbenzimidazol và các dẫn xuất của chúng, Hoechst 33258 và các dẫn xuất của chúng, Hoechst 33342 và các dẫn xuất của chúng, Hoechst 34580 và các dẫn xuất của chúng, hydroxystilbamidin và các dẫn xuất của chúng, LDS 751 và các dẫn

xuất của chúng, propidium iodit (PI) và các dẫn xuất của chúng, và các dẫn xuất của thuốc nhuộm Cy.

Theo sáng chế, phân tích đường cong nóng chảy huỳnh quang (fluorescence melting curve analysis - FMCA) được sử dụng làm phương pháp phân tích phản ứng lai và được thực hiện bằng cách phân loại, dựa trên nhiệt độ nóng chảy, sự khác biệt về độ bền liên kết giữa các sản phẩm được tạo ra sau khi hoàn thành PCR và mẫu dò được đưa vào. Không giống như các mẫu dò phát hiện SNP khác, thiết kế của mẫu dò rất đơn giản để mẫu dò được tạo ra bằng cách sử dụng các trình tự nucleotit 11 đến 18 me có chứa SNP. Do đó, để thiết kế mẫu dò có nhiệt độ nóng chảy mong muốn, giá trị T_m có thể được điều chỉnh theo chiều dài của mẫu dò PNA, và ngay cả trong trường hợp các mẫu dò PNA có cùng chiều dài, giá trị T_m có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi các mẫu dò. Vì PNA có độ bền liên kết cao hơn ADN và có giá trị T_m cơ bản cao, nên có thể thiết kế PNA có chiều dài ngắn hơn ADN, để có thể phát hiện ngay cả những SNP gần kề với nó. Trong phương pháp HRM thông thường, sự khác biệt về giá trị T_m thấp nhất là khoảng $0,5^{\circ}\text{C}$, do đó cần phải có chương trình phân tích bổ sung hoặc nhiệt độ thay đổi phút và rất khó thực hiện phân tích khi xuất hiện hai hoặc nhiều SNP. Ngược lại, mẫu dò PNA không bị ảnh hưởng bởi các SNP ngoài trình tự mẫu dò, và cho phép phân tích nhanh chóng và chính xác.

Theo phương án làm ví dụ của sáng chế, việc phát hiện sản phẩm khuếch đại được hợp nhất được thực hiện thông qua PCR thời gian thực, và về vấn đề này, có thể được thực hiện bằng cách chỉ thu được đường cong khuếch đại theo độ khuếch đại của sản phẩm khuếch đại hợp nhất để đo giá trị ngưỡng chu kỳ (C_t), chỉ thu được đường cong nóng chảy sau phản ứng chuỗi polymeraza để đo đỉnh nóng chảy bằng mẫu dò, hoặc thu được cả đường cong khuếch đại và đường cong nóng chảy và thu hai kết quả cùng nhau, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Vì sản phẩm khuếch đại hợp nhất được khuếch đại sớm do sự hiện diện của axit nucleic mục tiêu trong mẫu, lượng tín hiệu được tạo ra bởi mẫu dò phát hiện tăng

sớm, và do đó, số chu kỳ cần thiết để đạt đến ngưỡng giảm xuống để đo giá trị C_t thấp, giá trị này có thể được sử dụng để xác định sự có mặt hay không có mặt của axit nucleic mục tiêu. Ngoài ra, phân tích đường cong nóng chảy thường được thực hiện sau quy trình khuếch đại axit nucleic của phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực, và mẫu tín hiệu được đo trong khi nhiệt độ của mẫu được tăng lên với tốc độ 0,3 đến 1°C trong 1 đến 10 giây lên đến nhiệt độ cao (xấp xỉ 75°C đến 95°C) sau khi hạ xuống nhiệt độ thấp (xấp xỉ 25°C đến 55°C) hoặc được hạ xuống với tốc độ 0,3 đến 1°C cứ sau 1 đến 10 giây xuống nhiệt độ thấp sau khi được nâng lên nhiệt độ cao. Khi sản phẩm khuếch đại hợp nhất được khuếch đại, sự thay đổi dạng tín hiệu xuất hiện xung quanh nhiệt độ nóng chảy (T_m) của mẫu dò liên kết với sản phẩm khuếch đại hợp nhất thông qua phân tích đường cong nóng chảy và có thể được phân tích bằng cách sử dụng đỉnh nóng chảy để xác định sản phẩm khuếch đại hợp nhất.

Sáng chế cũng đề xuất hợp phần PCR để phát hiện đa mục tiêu, bao gồm:

i) n bộ mỗi có khả năng khuếch đại n mục tiêu tương ứng; và

ii) mẫu dò phát hiện có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại được khuếch đại bằng n bộ mỗi (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20),

trong đó mỗi bộ trong số n bộ mỗi bao gồm đoạn mỗi xuôi và đoạn mỗi ngược bao gồm trình tự thè, và

trình tự thè được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai là khác nhau.

Theo sáng chế, hợp phần PCR có thể bao gồm thêm p bộ mỗi có khả năng phát hiện p mục tiêu tương ứng (trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20), và có thể bao gồm thêm mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả p sản phẩm khuếch đại.

Sáng chế cũng đề xuất kit để phát hiện đa mục tiêu.

Theo sáng chế, kit có thể tùy ý bao gồm các chất phản ứng cần thiết cho phản ứng khuếch đại axit nucleic mục tiêu (ví dụ, phản ứng chuỗi polymeraza), như chất

đệm, ADN polymeraza, đồng yếu tố ADN polymeraza và các deoxyribonucleotit-5-triphosphat (dNTP). Tùy ý, kit theo sáng chế cũng có thể bao gồm các phân tử oligonucleotit khác nhau, enzym phiên mã ngược, các chất đệm và chất phản ứng khác nhau, và các kháng thể để ức chế hoạt động của các ADN polymeraza. Ngoài ra, lượng chất phản ứng tối ưu được sử dụng trong phản ứng cụ thể của kit có thể được xác định dễ dàng bằng kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này. Thông thường, thiết bị theo sáng chế có thể được sản xuất trong gói hoặc ngăn riêng biệt bao gồm các thành phần đã đề cập ở trên.

Theo một phương án, kit này có thể bao gồm phương tiện mang được phân vùng để chứa mẫu, bình bao gồm chất phản ứng, bình bao gồm mục tiêu thay thế và đoạn môi, và bình bao gồm mẫu dò để phát hiện các sản phẩm khuếch đại.

Phương tiện mang phù hợp để chứa một hoặc nhiều bình như chai và ống, và mỗi bình chứa bao gồm các thành phần độc lập được sử dụng trong phương pháp của sáng chế. Trong bản mô tả sáng chế, một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng phân phối các chất phản ứng cần thiết trong các bình.

Trong khi đó, theo sáng chế, mong đợi rằng mức độ biểu hiện của các gen mục tiêu so với gen tham chiếu có thể được so sánh và phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện.

Theo sáng chế, để xác nhận xem có thể phân tích mức độ biểu hiện của gen mục tiêu so với gen tham chiếu hay không, gen tham chiếu và gen mục tiêu đã được khuếch đại bằng các bộ môi tương ứng, mỗi bộ bao gồm trình tự thể, và sau đó đường cong nóng chảy được phân tích bằng một mẫu dò phát hiện duy nhất để xác định nhiệt độ nóng chảy mà tại đó tất cả gen tham chiếu và gen mục tiêu đều có thể phát hiện được và nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ các gen mục tiêu có thể phát hiện được, và giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy tương ứng được so sánh và phân tích.

Nghĩa là, theo một phương án của sáng chế, β -actin được đặt làm gen tham chiếu, PD-1 và PD-L1 được đặt làm gen mục tiêu, cADN được điều chế từ mARN của các dòng tế bào Hcc827, MDA và MRC5, mỗi gen được khuếch đại bằng các đoạn mồi bao gồm trình tự thể, mẫu dò phát hiện có khả năng liên kết với các trình tự thể đã được lai với các sản phẩm khuếch đại, và sau đó đường cong nóng chảy được phân tích, và từ kết quả phân tích, khẳng định rằng nhiệt độ mà tại đó β -actin và PD-1/PD-L1 có thể phát hiện được đồng thời là 50°C và nhiệt độ tại đó chỉ PD-1/PD-L1 có thể phát hiện được là 58°C .

Sau đó, giá trị Ct ở mỗi nhiệt độ được đo và kết quả của việc so sánh và phân tích sự khác biệt giữa chúng, khẳng định rằng, dựa trên sự biểu hiện của β -actin và PD-1/PD-L1 trong các tế bào MRC5 trong đó PD -1/PD-L1 thường được biểu hiện, PD-1/PD-L1 được biểu hiện trong Hcc82 nhiều hơn tương ứng là tám lần/18 lần, so với β -actin và được biểu thị trong MDA nhiều hơn năm lần/55 lần so với β -actin (xem Hình 6 và Hình 7).

Do đó, một phương án khác của sáng chế đề xuất phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của nhiều gen mục tiêu, bao gồm:

- a) thu thư viện cADN từ mẫu chứa đa mục tiêu;
- b) khuếch đại gen tham chiếu và các gen mục tiêu bằng bộ mồi có khả năng khuếch đại gen tham chiếu và n bộ mồi có khả năng khuếch đại tương ứng n gen mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20);
- c) lai các sản phẩm khuếch đại với mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả các sản phẩm khuếch đại của gen tham chiếu và các n sản phẩm khuếch đại;
- d) phân tích đường cong nóng chảy của các sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c); và

e) so sánh và phân tích các giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời và ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được,

trong đó mỗi bộ trong số n bộ mỗi bao gồm đoạn mỗi xuôi và đoạn mỗi ngược bao gồm trình tự thể, và

trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lại là khác nhau.

Theo sáng chế, việc so sánh và phân tích các giá trị Ct của quy trình e) có thể được thực hiện bằng cách:

i) thu được sự khác biệt giữa giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời và giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu có thể phát hiện được;

ii) chuyển đổi sự khác biệt giữa các giá trị Ct bằng cách sử dụng Phương trình 1 bên dưới; và

Phương trình 1: giá trị được quy đổi = $2^{(\text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được} - \text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể phát hiện đồng thời})}$ của đối chứng / $2^{(\text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được} - \text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể phát hiện đồng thời})}$ của nhóm thí nghiệm

iii) xác nhận các mức độ biểu hiện so với gen tham chiếu thông qua giá trị được quy đổi.

Theo sáng chế, thư viện cADN có thể được thu từ mẫu bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết, và tốt hơn là, thư viện cADN có thể được thu từ mARN được chiết xuất thông qua PCR phiên mã ngược (RT-PCR).

Theo sáng chế, để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư, nhóm thử nghiệm hoặc gen mục tiêu có thể là một hoặc nhiều gen bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm PD-1, PD-L1, CTL4, LAG3, TIM3, BTLA, TIGIT, VISTA, KIR, A2AR, B7-H3, B7-H4, CD277 và IDO, hoặc có thể là một hoặc nhiều gen bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm miR-17, miR-18a, miR-20a, miR-21, miR-27a và miR-155, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, gen đối chứng hoặc gen tham chiếu có thể là một hoặc nhiều gen giữ nhà bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm β -actin, α -tubulin và GAPDH, nhưng sáng chế không giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với tham chiếu đến các ví dụ sau. Đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, sẽ thấy rõ rằng những ví dụ này chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Phát hiện 6 loại virus và 5 loại vi khuẩn gây bệnh viêm màng não

Phát hiện 6 loại virus gây bệnh viêm màng não (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV và HHV-6), và 5 vi khuẩn gây bệnh viêm màng não (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Listeria monocytogenes*, *Liên cầu khuẩn nhóm B* và *Neisseria meningitides*), các đoạn mỗi xuôi, đoạn mỗi ngược, mỗi đoạn bao gồm trình tự thể, và các mẫu dò huỳnh quang PNA chức năng kép được cung cấp (xem Bảng 2 và Bảng 3).

Bảng 2

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự (5'-3')	Mục tiêu
1	V1-F	GCTGTTCTCGTTCCTCACTGCC	HSV-1
2	V1-R	<u>TGAAAATGCGAGTGTCCATACCCTAC</u>	

		CCGCGTTCGGAC	
3	V2-F	CGCCAAATACGCCTTAGCAGAC	HSV-2
4	V2-R	<u>TGAAAATGGAAGTGT</u> CAGGTTCTTCC CGCGAAATCG	
5	V3-F	CCTTCAATTGCTTGGCGGACTCGG	VZV
6	V3-R	<u>TGATAATGCAAGTCT</u> CACAAGATGAG CGAGTGTACCGATG	
7	V4-F	GCTGTAACTGTGGTTTCCATGACG	CMV
8	V4-R	<u>TGAAAATGCAAGTGT</u> CCGTGTGGCTT ACCTGCTGCC	
9	V5-F	AGCGGGGTATGAGCTTTCCTGTTAC	EBV
10	V5-R	<u>TCAAAATGCAAGTGT</u> CCAGTCGGGCG AAATCTGTGTACC	
11	V6-F	GATATCGGATCGCAACAAGACCTCG	HHV-6
12	V6-R	<u>TGAAGATGGAAGTGT</u> CTCCGTTGCGT AATATGTCAAGGATGC	
13	B1-F	GGTCAATTCCTGTGCGCAGTACC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14	B1-R	<u>CATGTGCCTACACCT</u> GGTCCAAACAG CCTTAGGTCTTATGG	
15	B2-F	GTACGCTAACACTGCACGACG	<i>Haemophilus influenza</i>
16	B2-R	<u>CATGTGCATACACCT</u> GGTAACACTGA TGAACGTGGTACACCAG	
17	B3-F	GTTGACCGCAAATAGAGCCAAGC	<i>Listeria monocytogenes</i>
18	B3-R	<u>CATGTGCCTACACG</u> AGGTATTAGCGA GAACGGGACCATCATG	
19	B4-F	CAGCAACAACGATTGTTTCGCC	<i>Liên cầu khuẩn nhóm B</i>
20	B4-R	<u>CATGTCCATACACCT</u> GCTTCCTCTTTA	

		GCTGCTGGAAC	
21	B5-F	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT	<i>Neisseria meningitides</i>
22	B5-R	CATATCCCTACACCTGCCACCCGTGTG GATCATAATAGA	

Các chữ cái được gạch chân; trình tự gắn thẻ ở đầu 5' của đoạn mỗi ngược

Bảng 3

Trình tự mẫu dò

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự (5'-3')	Huỳnh quang
23	Phát hiện P1	CAT GTG CCT ACA CCT G	FAM
24	Phát hiện P2	TGA AAA TGC AAG TGT C	TxR

Thí nghiệm phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực đã được thực hiện bằng cách sử dụng PCR bất đối xứng để tạo ra các axit nucleic mục tiêu sợi đơn. Các điều kiện PCR bất đối xứng như sau: dung dịch đệm 2X SeaSunBio Real-Time FMCA™ (SeaSunBio, Hàn Quốc); 2,5 mM MgCl₂; 200 μM dNTP; 1,0U Taq polymeraza; 0,05 μM đoạn mỗi xuôi (xem Bảng 2); và 0,5 μM đoạn mỗi ngược (xem Bảng 2) (PCR bất đối xứng), và 0,5 μl của các mẫu dò PNA huỳnh quang (xem Bảng 3) được thêm vào thể tích cuối cùng là 20 μl để tiến hành phân tích PCR thời gian thực và các điều kiện phân tích và phân tích đường cong nóng chảy được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả, như được minh họa trên Hình 3, đã xác nhận rằng có thể phát hiện được 5 loại vi khuẩn và 6 loại virus gây bệnh viêm màng não.

Nguồn gốc của từng loại virus và từng loại vi khuẩn được trình bày trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Nguồn gốc của các virus và vi khuẩn

Số	Tên	Nguồn gốc
1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC27336
2	<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC13100
3	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC19418
4	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15313
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC14364
6	Virut Herpes ở người 1	KBPV-VR-52
7	Virut Herpes ở người 2	KBPV-VR-53
8	Virut Varicella zoster	Pnl huyết tương AMX VZV, Acrometrix
9	Virut Epstein-Barr	Bảng Acromatrix
10	Virut cytomegalo ở người	KBPV-VR-7
11	Virut Herpes ở người 6	Virut HHV-6 Tiêu chuẩn quốc tế số 1 của WHO

Ví dụ 2: Phân tích mức độ biểu hiện gen

2-1. Xác định nhiệt độ nóng chảy của các nhóm đối chứng và thí nghiệm

Để so sánh sự biểu hiện gen, các dòng tế bào chuẩn Hcc827, MDA và MRC5 đã được chọn (EA. Mittendorf và cộng sự, 2014, RHJ Janse và cộng sự, 2018, H Soliman và cộng sự, 2014), và cADN được tổng hợp từ ARN được chiết xuất từ các dòng tế bào tương ứng bằng cách sử dụng kit SuperiorScrip III phiên mã ngược (Enzymomics, RT006). Các điều kiện để tổng hợp cADN như sau: dung dịch đệm 5x First-Strand, 200 đơn vị enzym phiên mã ngược SuperiorScriptIII, 0,5 mM hỗn hợp dNTP, 10 mM DTT, 4 μ M oligo dT, 20 đơn vị chất ức chế RNaza được thêm vào tổng thể tích 20 μ l để khiến phản ứng xảy ra ở 37°C trong 5 phút, 50°C trong 1 giờ và 70°C trong 15 phút.

Để phân tích sự biểu hiện gen, các đoạn mồi của gen tham chiếu và gen mục tiêu được điều chế như được thể hiện trong Bảng 5. PCR được thực hiện trong hệ thống CFX96™Real-Time (BIO-RAD, Hoa Kỳ) bằng cách sử dụng mẫu dò huỳnh quang PNA chức năng kép được tạo ra theo Ví dụ 1.

Thí nghiệm phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực đã được thực hiện bằng cách sử dụng PCR bất đối xứng để tạo ra các axit nucleic mục tiêu sợi đơn. Các điều kiện PCR bất đối xứng như sau: dung dịch đệm 2X SeaSunBio FMCA™Real-Time (SeaSunBio, Hàn Quốc); 2,5 mM MgCl₂; 200 μM dNTP; 1,0U Taq polymeraza; 0,05 μM đoạn mồi xuôi (xem Bảng 2); và 0,5 μM đoạn mồi ngược (xem Bảng 2) (PCR bất đối xứng), và 0,5 μl của các mẫu dò PNA huỳnh quang (xem Bảng 3) được thêm vào thể tích cuối cùng là 20 μl để tiến hành phân tích PCR thời gian thực và điều kiện phân tích và phân tích đường cong nóng chảy được minh họa trên Hình 4.

Để xác định nhiệt độ gắn thích hợp cho việc phân tích giá trị Ct của β-actin và PD-1/PD-L1, các điều kiện phát hiện của PD-1/PD-L1 được đặt ở 54°C đến 60°C và điều kiện cho β-actin và PD-1/PD-L1 có thể phát hiện đồng thời được đặt ở 48°C đến 52°C và tiến hành phân tích, từ đó xác nhận rằng 50°C và 58°C là nhiệt độ thích hợp nhất để phân tích (xem Hình 5).

Bảng 5

Trình tự đoạn mồi

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự (5'-3')	Mục tiêu
25	β-actin-F	GCACTCTTCCAGCCTTCC	β-actin
26	β-actin-R	<u>TGAAAATGGAAGTGTCAGCACTG</u> TGTTGGCGTACAG	β-actin
27	PD-1-F	CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAG	PD-1
28	PD-1-R	<u>TGAAAATGCAAGTCTCCCACGAC</u> ACCAACCACCAGG	PD-1

29	PD-L1-F	TGCTGAACGCATTTACTGTCACGG	PD-L1
30	PD-L1-R	<u>TGAAAATGCAAGTCTC</u> ACCATAGC TGATCATGCAGCGGTA	PD-L1

Các chữ cái được gạch chân; trình tự gắn thẻ ở đầu 5' của đoạn mồi ngược

2-2. Phân tích mức độ biểu hiện của các nhóm đối chứng và thử nghiệm

Để đo các giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy 50°C và 58°C xác định được bằng phương pháp của Ví dụ 2-1, PCR thời gian thực được thực hiện bằng cách sử dụng các vật liệu như trong Ví dụ 2-1 trong các điều kiện được thể hiện trên Hình 6, và sau đó mức độ biểu hiện gen được phân tích bằng phương trình bên dưới:

Phương trình để phân tích mức độ biểu hiện gen: $2^{-(Ct58-Ct50)}$ của gen tham chiếu/ $2^{-(Ct58-Ct50)}$ của gen mục tiêu

Từ các kết quả, như được minh họa trên các Hình 7 và Hình 8, xác nhận rằng gen PD-1 và PD-L1 cho thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện trong tế bào HCC-827 và MDAMB-231, so với dòng tế bào MRC-5 làm đối chứng.

Nguồn gốc của các dòng tế bào được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Các nguồn gốc của dòng tế bào

Số	Tên dòng tế bào	Nguồn gốc
1	MRC-5	KCLB10171
2	HCC-827	KCLB70827
3	MDAMB-231	ATCC HTB-26

Mặc dù các phương án cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, nhưng đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ thấy rõ rằng các mô tả chi tiết đó chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới

hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi thực chất của sáng chế nên được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và các dạng tương đương của nó.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phương pháp phát hiện đa mục tiêu theo sáng chế cho phép phát hiện đa mục tiêu bằng cách sử dụng một mẫu dò duy nhất, và do đó rất hữu ích để phát hiện đa mục tiêu vì khả năng dương tính giả được giảm và đa mục tiêu có thể phát hiện được với độ nhạy cao và tốc độ nhanh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện đa mục tiêu, phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu ADN từ mẫu chứa đa mục tiêu;

b) khuếch đại nhiều axit nucleic mục tiêu bằng cách sử dụng n bộ mồi có khả năng khuếch đại tương ứng n nhiều axit nucleic mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20);

c) lai n sản phẩm khuếch đại với một mẫu dò phát hiện duy nhất có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại; và

d) phân tích đường cong nóng chảy của từng sản phẩm trong số n sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c) để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của axit nucleic mục tiêu,

trong đó mỗi bộ mồi trong số n bộ mồi bao gồm

đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược bao gồm trình tự thể,

trong đó trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng lai là khác nhau.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sự chênh lệch nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 2°C đến 40°C.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước b), p bộ mồi có khả năng phát hiện p mục tiêu tương ứng (trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20) được đưa vào thêm, và trong bước c), mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả p sản phẩm khuếch đại được đưa vào thêm.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 3, trong đó mẫu dò phát hiện là oligonucleotit, axit nucleic peptit (peptide nucleic acid - PNA), hoặc axit nucleic bị khóa (locked nucleic acid - LNA), và ở các đầu đôi diện của nó, có chất chỉ thị và chất dập tắt được liên kết ở đó.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất chỉ thị bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 6-cacboxyfluorescein (FAM), Texas Red, 2',4',5',7',-tetrachloro-6-cacboxy-4,7-diclorofluorescein (HEX), và CY5.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chất dập tắt bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 6-cacboxytetrametyl-rhodamin (TAMRA), BHQ1, BHQ2, và Dabcyl.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc phân tích đường cong nóng chảy được thực hiện bằng phân tích đường cong nóng chảy huỳnh quang (fluorescence melting curve analysis - FMCA).
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc khuếch đại được thực hiện bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) thời gian thực.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu được chọn từ nước, đất, chất thải, thực phẩm, các chất có nguồn gốc từ người, ruột động vật, mô động vật và thực vật.
10. Hợp phần PCR để phát hiện đa mục tiêu, hợp phần PCR bao gồm:
 - i) n bộ môi có khả năng khuếch đại n mục tiêu tương ứng; và
 - ii) mẫu dò phát hiện có khả năng lai với n sản phẩm khuếch đại được khuếch đại bằng n bộ môi (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20),
 trong đó mỗi bộ môi trong số n bộ môi bao gồm đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược bao gồm trình tự thể,
 trong đó trình tự thể được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng được lai là khác nhau.
11. Hợp phần PCR theo điểm 10, còn bao gồm p bộ môi có khả năng phát hiện p mục tiêu tương ứng (trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20), và còn bao gồm mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả p sản phẩm khuếch đại.
12. Phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của nhiều gen mục tiêu, phương pháp

này bao gồm các bước:

- a) thu thư viện cADN từ mẫu chứa đa mục tiêu;
 - b) khuếch đại gen tham chiếu và các gen mục tiêu bằng bộ mồi có khả năng khuếch đại gen tham chiếu và n bộ mồi có khả năng khuếch đại tương ứng n gen mục tiêu (trong đó n là số nguyên từ 2 đến 20);
 - c) lai các sản phẩm khuếch đại với mẫu dò phát hiện có khả năng lai với tất cả các sản phẩm khuếch đại của gen tham chiếu và các n sản phẩm khuếch đại;
 - d) phân tích đường cong nóng chảy của các sản phẩm phản ứng được lai trong quy trình c); và
 - e) so sánh và phân tích các giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và gen mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời và ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được,
- trong đó mỗi bộ mồi trong số n bộ mồi bao gồm đoạn mồi xuôi và đoạn mồi ngược bao gồm trình tự thẽ,
- trong đó trình tự thẽ được thiết kế sao cho nhiệt độ nóng chảy của n sản phẩm phản ứng được lai là khác nhau.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó việc so sánh và phân tích các giá trị Ct của bước e) được thực hiện bằng cách:

- i) thu nhận sự khác biệt giữa giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó gen tham chiếu và các gen mục tiêu có thể được phát hiện đồng thời và giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu có thể phát hiện được;
- ii) chuyển đổi sự khác biệt giữa các giá trị Ct bằng cách sử dụng phương trình 1 bên dưới; và

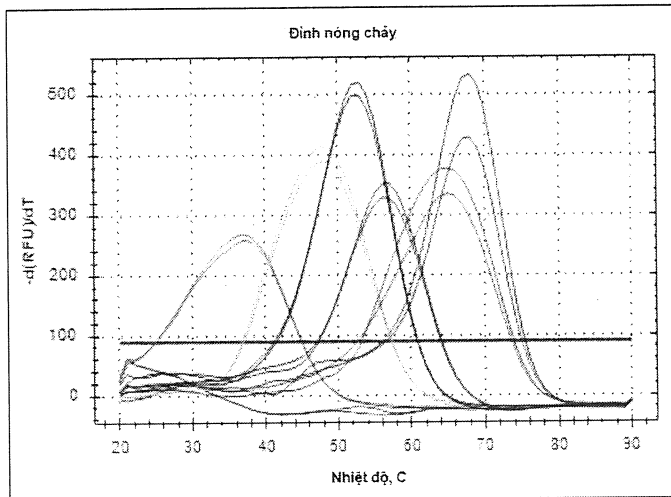
phương trình 1: giá trị được quy đổi = $2^{(\text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được} - \text{giá trị Ct ở nhiệt độ nóng chảy mà tại})}$

đó gen tham chiếu và các gen mục tiêu có thể phát hiện đồng thời) của đối chứng/ $2^{\Delta C_t}$ (giá trị C_t ở nhiệt độ nóng chảy mà tại đó chỉ gen mục tiêu mới có thể phát hiện được - giá trị C_t ở nhiệt độ nóng chảy tại mà đó gen tham chiếu và các gen mục tiêu có thể phát hiện đồng thời) của nhóm thí nghiệm

iii) xác nhận các mức độ biểu hiện so với gen tham chiếu thông qua giá trị được quy đổi.

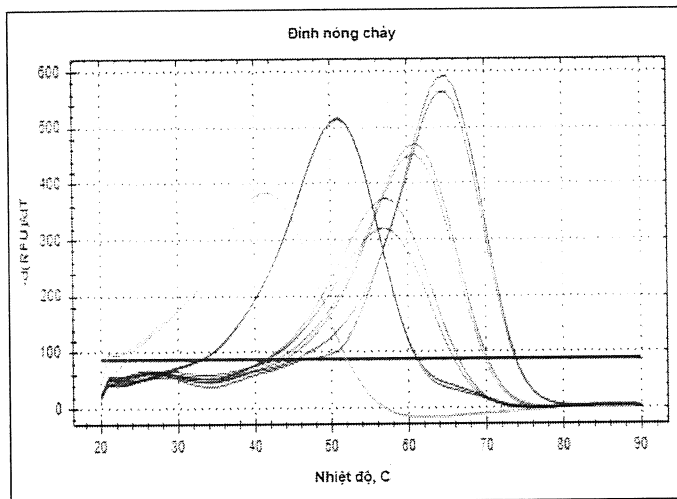


A. PHÁT HIỆN VI RÚT VIÊM MÀNG NÃO



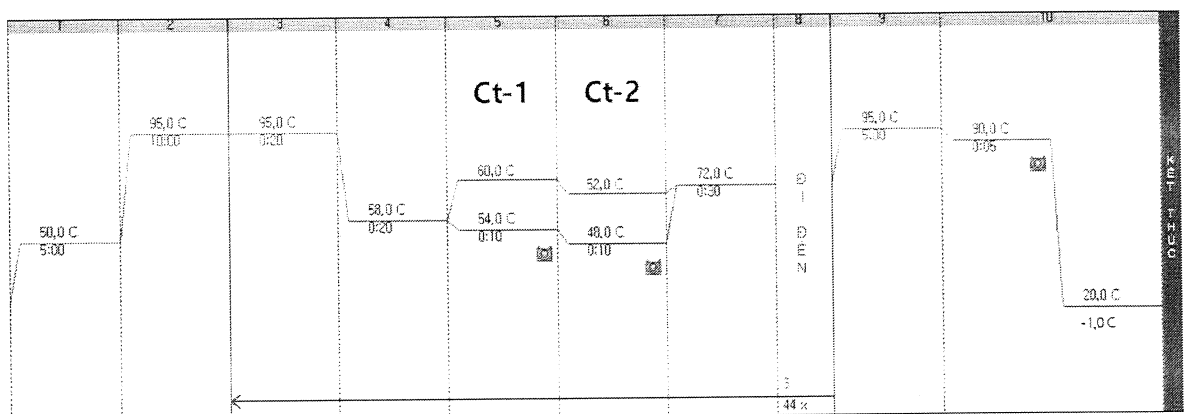
Mục tiêu	Nhiệt độ (°C)
EBV	68
CMV	64
HSV-1	57
HSV-2	53
VZV	48
HHV-6	37

B. PHÁT HIỆN VI KHUẨN VIÊM MÀNG NÃO



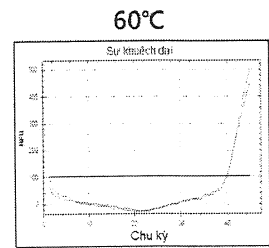
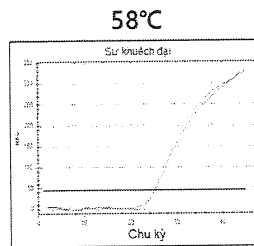
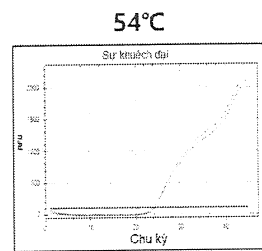
Mục tiêu	Nhiệt độ (°C)
<i>S.pneumoniae</i>	65
<i>S.agalactiae</i>	61
<i>L. monocytogenes</i>	56
<i>H.influenzae</i>	51
<i>N.meningitidis</i>	43

HÌNH 3

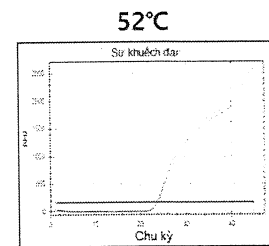
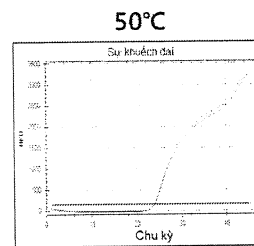
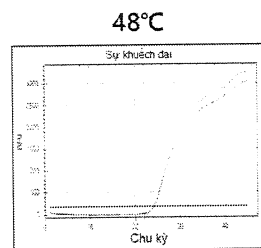


HÌNH 4

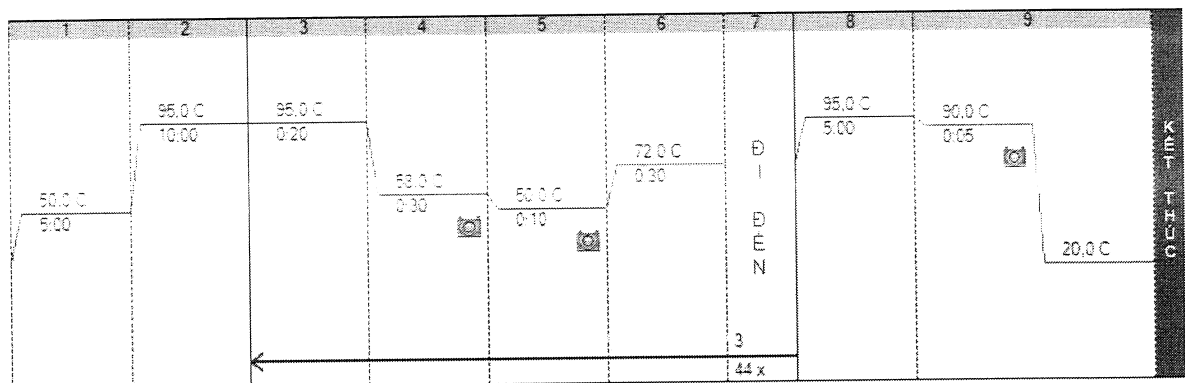
Ct 1



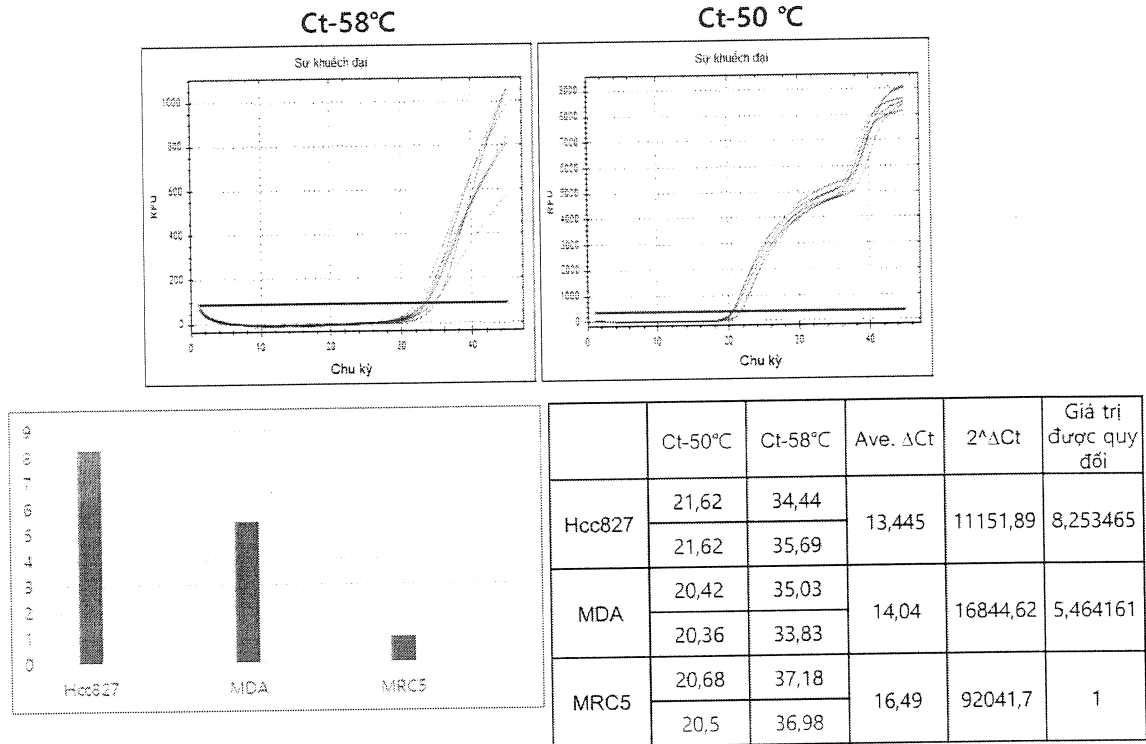
Ct 2



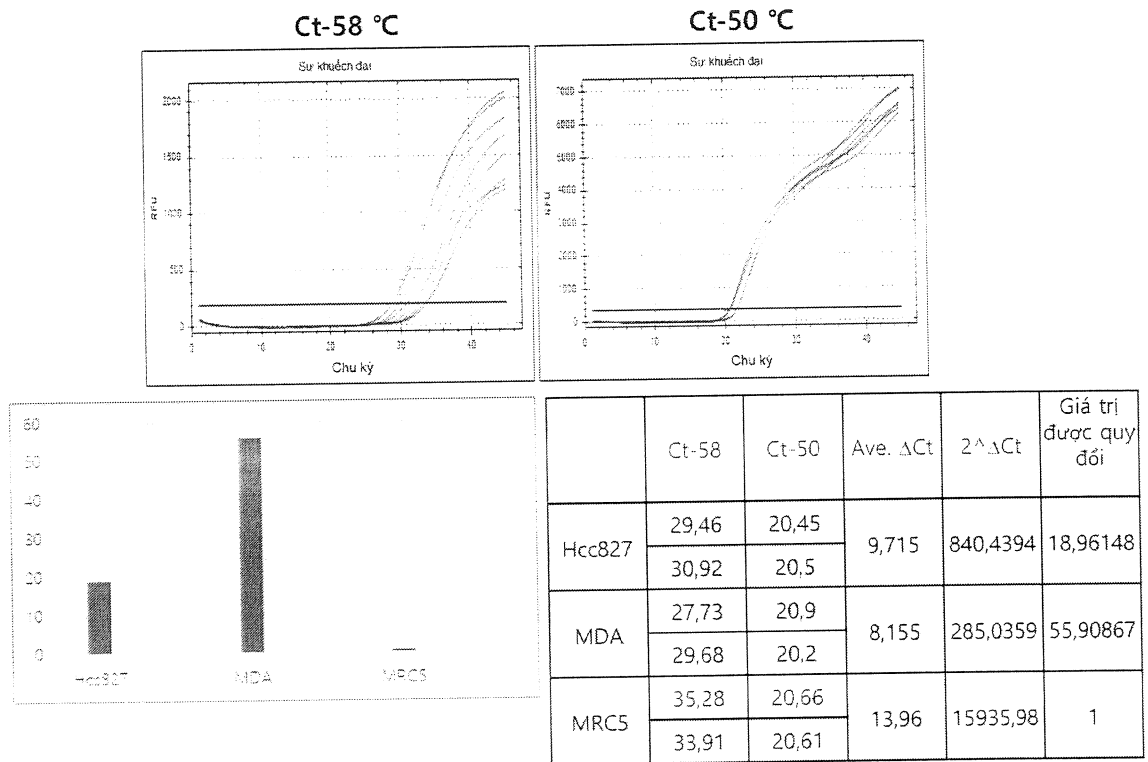
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SeasunBio Materials

<120> Phương pháp phát hiện đa mục tiêu dựa trên một mẫu dò phát hiện duy nhất sử dụng trình tự thẻ SNP và hợp phần PCR để phát hiện đa mục tiêu

<130> P18-B315

<160> 30

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> V1-F

<400> 1

gctgttctcg ttcctcactg cc

22

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

<213> V1-R

<400> 2

tgaaaatgcg agtgtccata ccctacccgc gttcggac

38

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> V2-F

<400> 3

cgccaaatac gccttagcag ac

22

<210> 4

<211> 36

<212> ADN

<213> V2-R

<400> 4

tgaaaaatgga agtgtcaggt tcttcccgcg aaatcg

36

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> V3-F

<400> 5

ccttcaattg cttggcggac tcgg

24

<210> 6

<211> 40

<212> ADN

<213> V3-R

<400> 6

tgataatgca agtctcaciaa gatgagcgag tgtaccgatg

40

<210> 7

<211> 24

<212> ADN

<213> V4-F

<400> 7

gctgtaactg tggtttccat gacg

24

<210> 8

<211> 36

<212> ADN

<213> V4-R

<400> 8

tgaaaaatgca agtgtccgtg tggcttacct gctgcc

36

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> V5-F

<400> 9

agcgggggtat gagctttcct gttac

25

<210> 10

<211> 39

<212> ADN

<213> V5-R

<400> 10

tcaaaatgca agtgtccagt cgggcgaaat ctgtgtacc

39

<210> 11

<211> 25

<212> ADN

<213> V6-F

<400> 11

gatatcggat cgcaacaaga cctcg

25

<210> 12

<211> 42

<212> ADN

<213> V6-R

<400> 12

tgaagatgga agtgtctccg ttgcgtaata tgtcaaggat gc

42

<210> 13

<211> 22

<212> ADN

<213> B1-F

<400> 13

ggtcaattcc tgtcgcagta cc

22

<210> 14

<211> 41

<212> ADN

<213> B1-R

<400> 14

catgtgccta cacctgggtcc aaacagcctt aggtccttatg g

41

<210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> B2-F

<400> 15

gtacgctaac actgcacgac g

21

<210> 16

<211> 43

<212> ADN

<213> B2-R

<400> 16

catgtgcata cacctggtaa cactgatgaa cgtggtacac cag

43

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> B3-F

<400> 17

gttgaccgca aatagagcca agc

23

<210> 18

<211> 42

<212> ADN

<213> B3-R

<400> 18

catgtgccta cacgaggtat tagcgagaac gggaccatca tg

42

<210> 19

<211> 22

<212> ADN

<213> B4-F

<400> 19

cagcaacaac gattgtttcg cc

22

<210> 20

<211> 38

<212> ADN

<213> B4-R

<400> 20

catgtccata cacctgcttc ctcttttagct gctggaac

38

<210> 21

<211> 25

<212> ADN

<213> B5-F

<400> 21

gcacacttag gtgatttacc tgcac

25

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

<213> B5-R

<400> 22

catatcccta cacctgccac ccgtgtggat cataataga

39

<210> 23

<211> 16

<212> ADN

<213> Phát hiện P1

<400> 23

catgtgccta cacctg

16

<210> 24

<211> 16

<212> ADN

<213> Phát hiện P2

<400> 24

tgaaaatgca agtgtc

16

<210> 25

<211> 18

<212> ADN

<213> Yâ-actin-F

<400> 25

gcactcttcc agccttcc

18

<210> 26

<211> 36

<212> ADN

<213> Yâ-actin-R

<400> 26

tgaaaatgga agtgtcagca ctgtgttggc gtacag

36

<210> 27

<211> 22

<212> ADN

<213> PD-1-F

<400> 27

cagagctcag ggtgacagag ag

22

<210> 28

<211> 36

<212> ADN

<213> PD-1-R

<400> 28

tgaaaatgca agtctccac gacaccaacc accagg

36

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

<213> PD-L1-F

<400> 29

tgctgaacgc atttactgtc acgg

24

<210> 30

<211> 40

<212> ADN

<213> PD-L1-R

<400> 30

tgaaaatgca agtctcacca tagctgatca tgcagcggta

40