



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

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

(11)



2-0003982

(51) **C12Q 1/68**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00501

(22) 27/08/2021

(62) 2-2021-00355

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/06/2024 435

(76) 1. Đặng Tiến Trường (VN)

Phòng 702, V3, Victoria Văn Phú, Phú La, Hà Đông, Hà Nội

2. Nguyễn Thanh Tùng (VN)

Số 29, Liền kề 1, Khu đô thị An Hưng, Hà Đông, Hà Nội

3. Nguyễn Duy Bắc (VN)

Số 29, Liền kề 1, Khu đô thị An Hưng, Hà Đông, Hà Nội

4. Nguyễn Minh Tâm (VN)

Số LK01-NO07, Cây Quýt, Khu đô thị Văn Khê, Hà Đông, Hà Nội

5. Nguyễn Văn Điều (VN)

Số 39, Ngõ 99, tập thể Ô tô 3, Kiến Hưng, Hà Đông, Hà Nội

6. Trần Ngọc Anh (VN)

P1630, nhà CT3 Tây Nam Linh Đàm, Hoàng Liệt, Hoàng Mai, Hà Nội

(54) **QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH TRẠNG THÁI ĐỘT BIẾN DI TRUYỀN LIÊN KẾT
CỦA GEN F8**

(21) 2-2023-00501

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8, trong đó phương pháp này cho phép khuếch đại 13 đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin của mẫu bố, mẹ và phôi để xác định trạng thái di truyền liên kết trên gen F8. Quy trình theo sáng chế cho phép đánh giá chính xác trạng thái di truyền của phôi dựa trên tổ hợp phân tích di truyền liên kết 13 đoạn chỉ thị STR và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin với phản ứng PCR đa môi duy nhất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và công nghệ di truyền ứng dụng trong y học. Cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 trên cơ sở chỉ thị các trình tự lặp ngắn (short tandem repeat: STR). Sáng chế cũng đề cập đến bộ môi dùng trong phản ứng PCR đa môi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của gen F8 trong PCR đa môi để đánh giá trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ưa chảy máu còn gọi là hemophilia là bệnh rối loạn đông máu di truyền hay gặp nhất, biểu hiện lâm sàng chủ yếu là máu chảy khó cầm ở các vết thương, khối máu tụ ở khớp, cơ thường xuất hiện nhiều lần ở một khớp. Người mắc bệnh này thường xuyên phải truyền máu với dung tích lớn và không được hoạt động mạnh. Bệnh liên quan đến rối loạn đông máu di truyền liên kết nhiễm sắc thể (NST) X, do đột biến gen F8, giảm yếu tố VIII, gây chảy máu khó đông, có thể dẫn tới tử vong. Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh khoảng 1/5000 người nam. Ở Việt Nam, Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương thống kê khoảng 30.000 người mang gen F8 đột biến. Điều trị Hemophilia A chủ yếu bằng truyền máu tươi hoặc yếu tố VIII nên kinh phí điều trị rất cao và không giải quyết được nguyên nhân bị bệnh. Vì vậy, việc dự phòng không sinh con bị bệnh hoặc không mang gen bằng chẩn đoán trước sinh và phân tích di truyền tiền làm tổ là rất cần thiết.

Gen F8 nằm ở vị trí Xq28 trên NST giới tính X (chrX: 154,835,795-155,022,753; University of California, Santa Cruz genome browser, GRCh38/hg38), đây là một trong những gen lớn nhất của người, có kích thước 186 kb gồm 26 exon trong đó 24 exon có kích thước từ 62 bp - 262 bp và 2 exon lớn nhất exon 14 (3106 bp) và exon 26 (1958 bp), mã hóa cho protein FVIII gồm 2332 axit amin và có trọng lượng phân tử khoảng 300 kD. Khi gen F8 bị đột biến, tế bào bị giảm hoặc bị mất khả năng tổng hợp protein FVIII gây nên bệnh Hemophilia A.

Dạng đột biến thường gặp nhất là đảo đoạn intron 22 (chiếm từ 45 đến 50% bệnh nhân) và intron 1 (chiếm khoảng 5% bệnh nhân) của gen F8. Đảo đoạn intron 22 xảy ra do sự tái tổ hợp giữa bản sao của vùng int22h1 (vùng lặp lại gồm 9,5 kb) thuộc intron 22 với một trong hai bản sao của vùng đồng nhất nằm ở telomere vùng int22h2, int22h3; vị trí 400 kb ở đầu 5' ngoài gen F8. Hiện tượng đảo đoạn dẫn đến đứt gãy gen F8 và hậu quả gây thể bệnh nặng cho bệnh nhân với biểu hiện kiểu hình là chảy máu ở mức độ nặng và biến dạng khớp. Đảo đoạn intron 1 xảy ra tương tự, do sự tái tổ hợp vùng int1h1 thuộc intron 1 (kích thước 900 bp) nằm vị trí 140 kb ở đầu 5' của gen F8 với bản sao int1h2 nằm ngoài gen F8. Đột biến mất đoạn lớn chiếm từ 2 đến 5% bệnh nhân Hemophilia A thể nặng. Có thể mất 1 exon hoặc mất toàn bộ gen. Cơ chế phân tử của dạng đột biến này đã được kết luận là do quá trình tái tổ hợp do hiện tượng lặp lại Alu. Đột biến chèn đoạn lớn và hiện tượng Alu làm đứt gãy gen F8 và gây Hemophilia A thể nặng. Ngoài ra, đột biến thay thế một nucleotit cũng có thể gây Hemophilia A thể nặng: đột biến vô nghĩa (nonsense) tạo mã kết thúc hoặc đột biến mất nucleotit gây lệch khung dịch mã dẫn đến không tổng hợp hoặc tổng hợp protein không có chức năng. Đột biến tại vị trí nối intron và exon đã được các tác giả công bố. Nhiều đột biến thay thế ảnh hưởng đến dinucleotit CpG đã được phát hiện trên một số bệnh nhân, ví dụ đột biến c.6496C>T dẫn đến chuyển thành Arg2147X (Tại vị trí 6496 trên trình tự Genbank nucleotit C thay bằng nucleotit T khiến thay đổi protein Arginin ở vị trí 2147 thành codon kết thúc). Mất đoạn và chèn đoạn nhỏ cũng thường thấy trong Hemophilia A thể nặng, thay đổi từ 1-55 nucleotit. Phổ biến nhất là mất hoặc chèn nucleotit A vào exon 14, thường xảy ra trong vùng từ c.3637 đến c.4379. Đối với Hemophilia A thể vừa và nhẹ, cơ chế chính là đột biến điểm gây lệch khung dịch mã và đột biến thay thế nucleotit (missense), chiếm 90-95% bệnh nhân. Đột biến tại vị trí nối và vùng trình tự khởi đầu của gen được phát hiện ở một số bệnh nhân. Hiện tượng lặp đoạn exon 13 cũng được mô tả ở các bệnh nhân Hemophilia A thể nhẹ.

Kỹ thuật chẩn đoán trước sinh có khả năng giúp tránh sinh con mắc bệnh ưa chảy máu. Các phương pháp chẩn đoán trước sinh có xâm lấn cho bệnh nhân bị bệnh Hemophilia A bao gồm: phân tích ADN gai nhau, phân tích dịch ối, phân tích máu dây rốn. Phân tích gai nhau được thực hiện bằng cách sinh thiết mẫu bánh nhau từ tử cung bằng kim chọc qua đường bụng hay đường âm đạo của thai phụ dưới hướng dẫn của

siêu âm. Phân tích dịch ối được thực hiện bằng cách chọc hút dịch ối bằng một kim rất nhỏ, tiêm xuyên qua thành bụng vào tử cung dưới hướng dẫn của siêu âm và hút một lượng nhỏ nước ối cần thiết đủ để chẩn đoán. Phân tích máu dây rốn được thực hiện bằng cách chọc hút máu dây rốn dưới sự hướng dẫn của siêu âm, một đầu kim tiêm được đưa qua thành bụng của thai phụ vào tử cung, vào mạch máu trong dây rốn, khoảng 1cm từ vị trí lá nhau. Các phương pháp trên dựa trên lượng lớn ADN thu được từ thai nhi nên độ chính xác cao, và hiện được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán trước sinh. Tuy nhiên về mặt kỹ thuật, trong quá trình lấy mẫu do kim chọc hút hoặc sinh thiết phải xuyên qua hàng rào nhau thai và dây rốn nên có khả năng lẫn với máu mẹ. Kết quả là có khả năng dẫn đến sai lệch kết quả do lẫn gen dị hợp tử của mẹ. Để kiểm soát tình trạng này, khi chọc hút dịch ối, phải loại đi 2ml đầu tiên và ống tiêm thứ nhất, mẫu thực tế thu được sau khi gắn ống tiêm thứ hai và phải giảm tối đa số lần đi kim đồng thời dịch ối phải được nuôi cấy trong dịch chuyên dụng trong khoảng từ 5 đến 10 ngày để không cho tế bào máu của mẹ phát triển. Khi tiến hành các biện pháp chẩn đoán, sử dụng STR liên kết từ người cùng huyết thống mắc bệnh để xác định tình trạng đột biến gen của mẫu. Đối với mẫu sinh thiết gai nhau, có nguy cơ nhiễm máu mẹ cao hơn (<5%), vì rất khó loại bỏ triệt để màng rụng của mẹ khỏi các tế bào của thai nhi. Mặt khác, việc nuôi cấy mẫu gai nhau sinh thiết đều làm tăng nguy cơ nhiễm tế bào máu mẹ vì cả tế bào mẹ và thai nhi đều là một phần của cùng một mẫu mô.

Một nhược điểm lớn của kỹ thuật này là các phương pháp trên đều được tiến hành muộn, phân tích gai nhau được tiến hành từ tuần thứ 11 đến tuần thứ 14, phân tích dịch ối được tiến hành từ tuần thứ 16 đến 20 và phân tích máu dây rốn được tiến hành khi thai nhi ngoài 18 tuần tuổi. Cả ba phương pháp trên đều có nguy cơ gây sảy thai sau khi thực hiện thủ thuật (0,05-2%), rò ối, nhiễm khuẩn ối, lây truyền các bệnh truyền nhiễm cho thai (HIV, Viêm gan B,C,D...), và có thể gây ảnh hưởng bất lợi tới thai nhi ở những sản phụ bất đồng nhóm máu Rh với thai.

Đối với phôi thụ tinh trong ống nghiệm, việc phân tích di truyền nhằm lựa chọn mẫu phôi khỏe mạnh là một nhu cầu cho phép loại bỏ những phôi khiếm khuyết di truyền trước khi chuyển phôi. Việc lựa chọn này giúp khả năng chọn được phôi trước khi chuyển thay vì việc chỉ lựa chọn trên một thai nhi trong chẩn đoán trước sinh. Hơn

nữa, việc chọn lọc này còn giúp giảm vấn đề tâm lý, chi phí và bảo vệ sức khỏe của người phụ nữ.

Do gen F8 lớn và những biến dị di truyền gây ra bệnh Hemophilia A phức tạp nên khó có một kỹ thuật xác định trực tiếp các đột biến gen F8 trên tế bào phôi. Bên cạnh đó, hiện tượng khuếch đại hỏng một hoặc cả hai alen (Allele DropOut-ADO) ở mẫu tế bào phôi, được xác định trên 40% các ca chẩn đoán tiền làm tổ, điều này khiến dẫn tới chẩn đoán sai. Ngoài ra, ngoại nhiễm cũng là một nguyên nhân ảnh hưởng lớn tới kết quả chẩn đoán. Kỹ thuật phân tích liên kết gen sử dụng nhiều trình tự lặp ngắn (Short Tandem Repeat: STR) có thể giúp chẩn đoán đột biến gây bệnh Hemophilia A, nhất là trong phôi trước khi làm tổ tránh ngoại nhiễm.

Đã có một số công bố sử dụng các STR để phân tích liên kết gen trong đánh giá di truyền. Các đoạn STR cần có tính đa hình cao và nằm gần gen tổn thương để đảm bảo tính liên kết. Tỷ lệ dị hợp tử quan sát là một trong những chỉ tiêu quan trọng đánh giá tính đa hình của các STR, quyết định giá trị của STR trong chẩn đoán. Tỷ lệ dị hợp tử quan sát càng cao thì giá trị STR trong chẩn đoán càng cao. Do đó, việc xác định được các đoạn STR đặc hiệu cho các quần thể đặc trưng cần phải được khảo sát. Đã có một số nghiên cứu đánh giá tính đa hình trên quần thể người Brazil, New Zealand, Trung Quốc, nhằm lựa chọn các STR phục vụ chẩn đoán đột biến gen F8 gây bệnh Hemophilia A trong phôi thụ tinh trong ống nghiệm. Tuy nhiên, việc sử dụng các STR này cho người Việt Nam không thực sự hiệu quả do các STR lựa chọn nằm xa gen F8 nên vẫn chưa khắc phục được hiện tượng trao đổi chéo gây chẩn đoán sai.

Các báo cáo ở Việt Nam cho thấy đã có một số SRT được sử dụng để phân tích đột biến di truyền, tuy nhiên một số STR được lựa chọn nằm khá xa gen F8. Hơn nữa, các báo cáo trên thế giới thấy tính đa hình của các STR đã được sử dụng trong nghiên cứu khác là thấp, thậm chí tỷ lệ dị hợp tử quan sát chỉ đạt 1,5% trên một số quần thể người khác nhau.

Do đó, cần có quy trình xác định trạng thái các đột biến di truyền gen F8 dựa trên các SRT cho phép đánh giá tình trạng đột biến di truyền liên kết trên gen F8 ở phôi thụ tinh trong ống nghiệm và cần bộ môi tối ưu dùng trong quy trình này cho phép xác định được phôi mang hoặc không mang gen đột biến di truyền liên kết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên, bằng cách tối ưu hóa các đoạn mồi để nhân các chỉ thị đoạn ngắn lặp lại (short tandem repeat: STR), từ đó đánh giá được trạng thái đột biến gen F8 thông qua phân tích di truyền liên kết. Quy trình cho phép sàng lọc được các phôi đột biến. Bằng cách lựa chọn các đoạn mồi tối ưu cho phép nhân đặc hiệu các đoạn chỉ thị các trình tự lặp ngắn (Short tandem repeat: STR) liên kết với gen F8 trên cơ sở PCR đa mồi (multiplex PCR) gồm 13 STR bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1 và HEMA154498.9, quy trình sàng lọc đột biến trên gen F8 cho phép đánh giá tính trạng di truyền của phôi hiệu quả, chính xác, tin cậy.

Theo đó, sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 và bộ mồi dùng trong phản ứng PCR đa mồi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của gen F8.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết của gen F8 không nhằm mục đích chẩn đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, trong quy trình này bao gồm các bước:

a) xác định trạng thái đột biến gen F8 của mẹ bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu của mẹ và mẫu đối chứng thu được từ nam giới cùng huyết thống với mẹ bị đột biến gen F8, sau đó độc lập tiến hành PCR đa mồi với bộ mồi để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin, sau khi điện di mao quản, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN của mẹ và mẫu ADN đối chứng để xác định trạng thái đột biến của gen F8 của mẹ;

b) xác định trạng thái đột biến gen F8 của phôi thụ tinh trong ống nghiệm với bố bằng cách chiết ADN từ mẫu máu của bố và mẫu phôi 5 ngày tuổi cần xác định trạng thái đột biến gen F8, sau đó tiến hành PCR đa mồi với bộ mồi để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22,

F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin, sau khi điện di mao quản, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu của bố với mẫu phôi để xác định trạng thái đột biến gen F8 di truyền của phôi với bố;

c) kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi bằng cách phân tích di truyền liên kết của tổ hợp các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu của bố, mẹ, mẫu đối chứng với các đoạn chỉ thị SRT thu được từ phôi, căn cứ vào kích thước của các đoạn chỉ thị SRT đột biến xuất hiện trên phôi để kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi;

trong đó khác biệt ở chỗ bộ mồi dùng trong mỗi phản ứng PCR đa mồi để khuếch đại các đoạn chỉ thị SRT và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính bằng PCR đa mồi đối với các mẫu ADN thu được từ bố, mẹ, đối chứng và phôi bao gồm:

SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ (ng)	Thể tích (µl)
1	GGTTTTCCTCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCG AGTTATTAC	0,25	0,1
2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	0,25	0,1
3	GTAAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	0,2	0,1
4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG	0,2	0,1
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	0,4	0,2
6	GTTTCTCCCATCTATTCTTAAATAAGATAGC	0,4	0,2
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	0,2	0,1
8	GTTTCCTTTAGAATCACTCTTGGTGTG	0,2	0,1
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCT ATCCTCC	0,2	0,1
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	0,2	0,1
11	GGTTTTCCTCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	0,2	0,1
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	0,2	0,1

13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAACTGA ACAAC TAGAAGG	0,7	0,28
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	0,7	0,28
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	0,2	0,1
16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	0,2	0,1
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAG ATCACTTCTTTC	0,6	0,3
18	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC	0,6	0,3
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTC AGCCCC	0,4	0,2
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	0,4	0,2
21	GTAACACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	0,25	0,125
22	GGGTTAGTGGTACTCAAACAC	0,25	0,125
23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTCACTG	0,3	0,15
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC	0,3	0,15
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	0,3	0,15
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	0,3	0,15
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	0,15	0,075
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	0,15	0,075

để nhận đồng thời 13 đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến bộ môi dùng trong phản ứng PCR đa môi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính trong PCR đa môi trong quy trình theo sáng chế, trong đó bộ môi này bao gồm:

SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ (ng)	Thể tích (μ l)
1	GGTTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCG AGTTATTAC	0,25	0,1
2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	0,25	0,1
3	GTAAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	0,2	0,1
4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG	0,2	0,1
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	0,4	0,2
6	GTTTCTCCCATTTCTATTCCTAAATAAGATAGC	0,4	0,2
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	0,2	0,1
8	GTTTCCTTTAGAATCACTCTTGGTGTG	0,2	0,1
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCT ATCCTCC	0,2	0,1
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	0,2	0,1
11	GGTTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	0,2	0,1
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	0,2	0,1
13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAAACCTGA ACAAC TAGAAGG	0,7	0,28
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	0,7	0,28
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	0,2	0,1
16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	0,2	0,1
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAG ATCACTTCTTTC	0,6	0,3
18	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC	0,6	0,3
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTC AGCCCC	0,4	0,2
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	0,4	0,2
21	GTAAAACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	0,25	0,125
22	GGGTAGTGGTACTCAAACAC	0,25	0,125

23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTCAGT	0,3	0,15
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC	0,3	0,15
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	0,3	0,15
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	0,3	0,15
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	0,15	0,075
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	0,15	0,075

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các đoạn chỉ thị STR đích trong gen F8 được nhân bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 kết quả điện di mao quản của mẫu phôi Q1 thu được từ Ví dụ 1.

Hình 2 là kết quả điện di mao quản của mẫu phôi Q2 thu được từ Ví dụ 1.

Hình 3 là kết quả điện di mao quản của mẫu phôi Q3 thu được từ Ví dụ 1.

Hình 4 là kết quả điện di mao quản của mẫu phôi Q4 thu được từ Ví dụ 1.

Hình 5 là kết quả tổng hợp kết quả so sánh phân tích kiểu gen đơn bội để xác định trạng thái di truyền liên kết dựa trên các chỉ thị STR trên gen F8 được phân tích.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết của gen F8 không nhằm mục đích chẩn đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh và bộ môi dùng trong quy trình này.

Đối tượng phôi cần sàng lọc theo sáng chế là những phôi được thụ tinh trong ống nghiệm, trong đó có bố và/hoặc mẹ là người mắc bệnh hoặc trong dòng họ có người mắc bệnh ưa chảy máu di truyền. Do gen F8 nằm ở vị trí Xq28 trên NST giới tính X (chrX: 154,835,795 155,022,753; University of California, Santa Cruz genome browser, GRCh38/hg38), nên việc trao đổi nhiễm sắc thể từ bố hoặc mẹ bị mắc bệnh cho con có thể ở trạng thái di truyền đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Đối với các trạng thái dị hợp tử, phôi có thể mang gen đột biến, nhưng có thể không biểu hiện bệnh. Do người mẹ mang nhiễm sắc thể XX nên có khả năng di truyền nhiễm sắc thể mang đột biến hoặc nhiễm sắc thể không đột biến. Ngoài ra, đối với người bố, việc trao đổi nhiễm sắc thể có thể dẫn đến biểu hiện bệnh hoặc không. Do đó, phôi cần xác định đột biến di truyền liên kết gen F8 là phôi mà có bố và/hoặc mẹ mang gen đột biến di truyền và có ít nhất một người cùng huyết thống biểu hiện bệnh. Trong trường hợp đối với mẹ, cần xác định được ít nhất một người nam giới cùng huyết thống có biểu hiện ưa chảy máu di truyền.

Theo sáng chế, các đoạn chỉ thị STR trên gen F8 được lựa chọn bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9. Các chỉ thị STR này được các tác giả tiến hành sàng lọc bằng công cụ tin sinh học kết hợp tham khảo về chỉ số đa hình của các chỉ thị STR. Bằng cách sàng lọc, tối ưu hóa, các tác giả đã lựa chọn được bộ chỉ thị 13 STR. Khoảng cách từ các chỉ thị đến gen F8 nằm trong khoảng 1Mbp, đảm bảo tỉ lệ trao đổi chéo trong di truyền liên kết, nếu có là dưới 1%.

Ngoài ra, để xác định giới tính, đoạn chỉ thị cho nhiễm sắc thể giới tính amelogenin được sử dụng. Các đoạn môi này được thiết kế để nhận đặc hiệu 14 đoạn chỉ thị nêu trên (13) đoạn chỉ thị cho nhiễm sắc thể X và 1 đoạn chỉ thị cho nhiễm sắc thể giới tính. Các tác giả đã tối ưu và xây dựng bộ môi bao gồm 14 cặp môi nêu trong bảng sau:

SEQ ID NO	Trình tự môi	STR đích	Kích thước (bp)
1	GGTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCC GAGTTATTAC	DXS1073	152-172
2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC		
3	GTAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	REN90682	129-143

4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG		
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	REN90833	251-275
6	GTTTCTCCCATTTCTATTCCTAAATAAGATAGC		
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	F8Int25.2	175-181
8	GTTTCCTTTAGAATCACTCTTGGTGTG		
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCC TATCCTCC	F8Int22	207-217
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG		
11	GGTTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	F8Int21	116-128
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC		
13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAACTGA ACAAC TAGAAGG	F8Int13.2	309-321
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC		
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	F8Int1	188-198
16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC		
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTTCA GATCACTTCTTTC	stSG604486	226-238
18	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC		
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGT CAGCCCC	HEMA1541 30.5	179-215
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC		
21	GTAAAACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	THLMEInt2	234-256
22	GGGTTAGTGGTACTCAAACAC		
23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTC ACTG	THLMEInt1. 1	289-319
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC		
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	HEMA1544 98.9	235-267
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG		
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	Amelogenin	133/139
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG		

Các đoạn mỗi đặc hiệu để nhân 14 đoạn chỉ thị STR nêu trên được tối ưu hóa sao

cho không có khả năng bắt cặp chéo và nhân đặc hiệu trình tự đích. Việc sử dụng nhiều đoạn mồi trong một phản ứng PCR đa mồi cần phải tối ưu được đoạn mồi và đoạn gen đích cần nhân.

Để sàng lọc, tối ưu hóa quy trình PCR đa mồi và các đoạn mồi khuếch đại các STR, các tác giả đã tối ưu hóa nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi khuếch đại 14 STR nêu trên bằng cách thực hiện đánh giá trên bộ mồi thường và bộ mồi gắn huỳnh quang. ADN khuôn tách từ mẫu máu đạt yêu cầu về độ tinh sạch (A_{260}/A_{280} đạt từ 1,8 đến 2,0) sau khi tách chiết và được pha loãng về nồng độ 10 ng/ μ l để tiến hành PCR.

Chu trình nhiệt phản ứng multiplex PCR bao gồm bước khởi đầu phản ứng ở 95°C trong 15 phút; 30 chu kỳ nhiệt: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 60°C trong 90 giây, kéo dài mạch ở 72°C trong 60 giây. Bước tổng hợp sản phẩm cuối cùng của các cặp mồi ở 60°C trong 30 phút. Sau khi đánh giá 50 mẫu đối chứng và 103 mẫu mang gen F8 đột biến, các chỉ số H_o , H_e và PIC được đưa ra trong bảng cho thấy các chỉ thị STR và các đoạn mồi thu được là tối ưu.

Tên chỉ thị STR	50 mẫu đối chứng			103 mẫu mang gen			Tổng 153 mẫu		
	H_o	H_e	PIC	H_o	H_e	PIC	H_o	H_e	PIC
DXS1073	1	0,78	0,76	0,76	0,86	0,84	0,83	0,86	0,84
REN90682	1	0,8	0,78	0,85	0,84	0,82	0,9	0,87	0,86
REN90833	0,46	0,67	0,64	0,64	0,77	0,74	0,58	0,85	0,84
F8Int25.2	0,98	0,67	0,62	0,67	0,82	0,79	0,76	0,84	0,82
F8Int22	0,94	0,67	0,62	0,65	0,77	0,73	0,73	0,76	0,72
F8Int21	0,92	0,77	0,74	0,63	0,76	0,72	0,73	0,81	0,78
F8Int13.2	0,98	0,78	0,75	0,53	0,83	0,81	0,68	0,85	0,83
F8Int1	0,92	0,68	0,63	0,62	0,77	0,74	0,71	0,77	0,74
stSG604486	1	0,79	0,77	0,56	0,87	0,85	0,69	0,87	0,86
HEMA154130.5	0,98	0,87	0,86	0,82	0,89	0,88	0,87	0,9	0,89
THLMEInt2	0,98	0,87	0,86	0,8	0,85	0,84	0,86	0,88	0,87
THLMEInt1.1	0,58	0,79	0,77	0,61	0,84	0,82	0,6	0,86	0,84
HEMA154498.9	0,98	0,86	0,85	0,75	0,88	0,87	0,82	0,9	0,89

Căn cứ vào kết quả, các tác giả đã đề các điều kiện chung để thực hiện phản ứng

PCR đa môi với các thành phần như sau:

Thành phần		Nồng độ	Thể tích (μ l/phản ứng)
HPLC H ₂ O			1,84
Multiplex MasterMix 2X		1X	10,00
Môi	SEQ ID NO.1	0,25	0,1
	SEQ ID NO.2	0,25	0,1
	SEQ ID NO.3	0,2	0,1
	SEQ ID NO.4	0,2	0,1
	SEQ ID NO.5	0,4	0,2
	SEQ ID NO.6	0,4	0,2
	SEQ ID NO.7	0,2	0,1
	SEQ ID NO.8	0,2	0,1
	SEQ ID NO.9	0,2	0,1
	SEQ ID NO.10	0,2	0,1
	SEQ ID NO.11	0,2	0,1
	SEQ ID NO.12	0,2	0,1
	SEQ ID NO.13	0,7	0,28
	SEQ ID NO.14	0,7	0,28
	SEQ ID NO.15	0,2	0,1
	SEQ ID NO.16	0,2	0,1
	SEQ ID NO.17	0,6	0,3
	SEQ ID NO.18	0,6	0,3
	SEQ ID NO.19	0,4	0,2
	SEQ ID NO.20	0,4	0,2
	SEQ ID NO.21	0,25	0,125
	SEQ ID NO.22	0,25	0,125
	SEQ ID NO.23	0,3	0,15
	SEQ ID NO.24	0,3	0,15
	SEQ ID NO.25	0,3	0,15
	SEQ ID NO.26	0,3	0,15
	SEQ ID NO.27	0,15	0,075
	SEQ ID NO.28	0,15	0,075
Khuôn ADN			1,00
Tổng thể tích			20,00

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi thụ tinh trong ống nghiệm, trong quy trình này bao gồm các bước: a) xác định trạng thái đột biến gen F8 của mẹ; b) xác định trạng thái đột biến gen F8 của phôi thụ tinh trong ống nghiệm; và c) kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi.

Trong bước xác định trạng thái đột biến gen F8 của mẹ, cần xác định trạng thái đột biến gen F8 của người mẹ. Để xác định, tiến hành tách chiết ADN từ mẫu máu của mẹ và mẫu đối chứng thu được từ nam giới cùng huyết thống với mẹ bị mắc bệnh ưa chảy máu. Các kỹ thuật chiết tách ADN từ mẫu là đã biết và có thể thực hiện được bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc bằng kit chiết tách ADN theo hướng dẫn của nhà cung cấp. ADN tách từ mẫu máu đạt yêu cầu về độ tinh sạch (A260/A280 đạt từ 1,8 đến 2,0) sau khi tách chiết và được pha loãng về nồng độ 10 ng/ μ l để tiến hành PCR.

Tiến hành PCR đa môi lần lượt với ADN tổng số của mẹ, ADN tổng số của mẫu đối chứng với bộ môi bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-28 để nhận 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin. Các thành phần PCR đa môi được sử dụng bao gồm 6,8 μ l HPLC H₂O, 10 μ l Qiagen PCR Master Mix 2X, 0,2 μ l M13(-20), 0,2 μ l M13(-41), 0,2 μ l M13 (CM), 1 μ l ADN khuôn. Tùy vào kỹ thuật xử lý sau khi PCR mà các đoạn môi này có thể được gắn hoặc không gắn huỳnh quang để thuận lợi cho quá trình đánh giá kích thước sản phẩm PCR thu được. Các kỹ thuật gắn huỳnh quang là đã biết và có thể sử dụng các chất đánh dấu huỳnh quang thông dụng với các màu phát quang khác nhau.

Sau khi PCR, tiến hành điện di mao quản sản phẩm thu được với thành phần phản ứng như sau 10 μ l tổng thể tích bao gồm 8,5 μ l đệm điện di Hi-Di Formamit; 0,5 μ l GeneScan-500 LIZ và 1,0 μ l sản phẩm PCR. Chu trình nhiệt như sau: Biến tính ở 95^oC trong 5 phút. Kết quả điện di mao quản được phân tích, ví dụ bằng phần mềm GeneMapper 5.0.

Dựa trên kích thước thu được, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN của mẹ và kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN đối chứng để xác định trạng thái dị hợp tử gen F8 gây bệnh của mẹ. Căn cứ trên kích thước các đoạn chỉ thị thu được, có thể xác định được trạng thái đột biến gen trên gen F8 của mẹ.

Trong bước xác định trạng thái đột biến gen F8 của phôi thụ tinh trong ống nghiệm với bố, các bước thực hiện đối với ADN của bố tương tự như đối với mẫu người mẹ. Tuy nhiên, do mẫu phôi có lượng tế bào rất thấp, cần chiết ADN từ 1 tế bào phôi và khuếch đại gen (whole genome amplification: WGA) để có thể đủ lượng mẫu cho PCR đa môi. Theo đó mẫu tế bào được khuếch đại bằng, ví dụ kit REPLI-g Single Cell Kit theo quy trình của nhà sản xuất (QIAGEN, Đức).

Tiến hành PCR đa môi lần lượt với ADN tổng số của bố, ADN tổng số thu được từ PCR khuếch đại hệ gen của mẫu phôi bằng bộ môi bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-28 để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin. Các thành phần PCR đa môi được sử dụng bao gồm 6,8µl HPLC H₂O, 10µl Qiagen PCR Master Mix 2X, 0,2µl M13(-20), 0,2µl M13(-41), 0,2µl M13 (CM), 1µl ADN khuôn. Tùy vào kỹ thuật xử lý sau khi PCR mà các đoạn môi này có thể được gắn hoặc không gắn huỳnh quang để thuận lợi cho quá trình đánh giá kích thước sản phẩm PCR thu được. Các kỹ thuật gắn huỳnh quang là đã biết và có thể sử dụng các chất đánh dấu huỳnh quang thông dụng với các màu phát quang khác nhau.

Sau khi PCR, tiến hành điện di mao quản sản phẩm thu được với thành phần phản ứng như sau 10µl tổng thể tích bao gồm 8,5µl đệm điện di Hi-Di Formamit; 0,5µl GeneScan-500 LIZ và 1,0µl sản phẩm PCR. Chu trình nhiệt như sau: Biến tính ở 95⁰C trong 5 phút. Kết quả điện di mao quản được phân tích, ví dụ bằng phần mềm GeneMapper 5.0.

Dựa trên kích thước thu được, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN của bố và kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN phôi để

xác định trạng thái đột biến gen F8 của phôi. Căn cứ trên kích thước các đoạn chỉ thị thu được, có thể xác định được trạng đột biến gen F8 di truyền của phôi với bố.

Trong bước kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi, tiến hành phân tích di truyền liên kết của tổ hợp các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu của bố, mẹ, mẫu đối chứng với các đoạn chỉ thị SRT thu được từ phôi. Căn cứ vào kích thước của các đoạn chỉ thị SRT đột biến xuất hiện trên phôi dựa trên các đoạn chỉ thị SRT bình thường, đưa ra kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi.

Trong đó, quy trình theo sáng chế khác biệt ở chỗ bộ mồi dùng trong mỗi phản ứng PCR đa mồi để khuếch đại các đoạn chỉ thị SRT và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính bằng PCR đa mồi đối với các mẫu ADN thu được từ bố, mẹ, đối chứng và phôi bao gồm:

SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ (ng)	Thể tích (μl)
1	GGTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCG AGTTATTAC	0,25	0,1
2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	0,25	0,1
3	GTAAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	0,2	0,1
4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG	0,2	0,1
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	0,4	0,2
6	GTTTCTCCCATTCTATTCCTAAATAAGATAGC	0,4	0,2
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	0,2	0,1
8	GTTTCCTTTAGAATCACTCTTGGTGTG	0,2	0,1
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCT ATCCTCC	0,2	0,1
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	0,2	0,1
11	GGTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	0,2	0,1
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	0,2	0,1

13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAACTGA ACAAC TAGAAGG	0,7	0,28
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	0,7	0,28
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	0,2	0,1
16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	0,2	0,1
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAG ATCACTTCTTTC	0,6	0,3
18	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC	0,6	0,3
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTC AGCCCC	0,4	0,2
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	0,4	0,2
21	GTAAAACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	0,25	0,125
22	GGGTTAGTGGTACTCAAACAC	0,25	0,125
23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTCACTG	0,3	0,15
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC	0,3	0,15
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	0,3	0,15
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	0,3	0,15
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	0,15	0,075
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	0,15	0,075

để nhận đồng thời 13 đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin.

Cần lưu ý rằng, đối với trường hợp người mẹ khỏe mạnh, nghĩa là người mẹ không mắc bệnh và không có gen F8 đột biến, và trong số những người cùng huyết thống, không có ai mắc bệnh, khi đó hoàn toàn có thể loại trừ mẫu đối chứng và kết luận trạng thái đột biến gen F8 của người mẹ mà không cần phải qua bước phân tích di truyền. Đồng thời, đối với trường hợp người bố khỏe mạnh, khi đó không cần bước đánh giá

trạng thái đột biến gen F8 của phôi đối với bố. Theo đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể tùy biến kỹ thuật để phù hợp với tình trạng ban đầu của phôi.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến bộ môi dùng trong phản ứng PCR đa môi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính trong PCR đa môi theo quy trình theo sáng chế, trong đó bộ môi này bao gồm:

SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ (ng)	Thể tích (μl)
1	GGTTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCG AGTTATTAC	0,25	0,1
2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	0,25	0,1
3	GTAAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	0,2	0,1
4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG	0,2	0,1
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	0,4	0,2
6	GTTTCTCCCATTTCTATTCCTAAATAAGATAGC	0,4	0,2
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	0,2	0,1
8	GTTTCCTTTAGAAATCACTCTTGGTGTG	0,2	0,1
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCT ATCCTCC	0,2	0,1
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	0,2	0,1
11	GGTTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	0,2	0,1
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	0,2	0,1
13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAACTGA ACAAC TAGAAGG	0,7	0,28
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	0,7	0,28
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	0,2	0,1

16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	0,2	0,1
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAG ATCACTTCTTTC	0,6	0,3
18	GTTTGTACGGTTTTCTTTGTGGC	0,6	0,3
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTC AGCCCC	0,4	0,2
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	0,4	0,2
21	GTAACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	0,25	0,125
22	GGGTTAGTGGTACTCAAACAC	0,25	0,125
23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTCACTG	0,3	0,15
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC	0,3	0,15
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	0,3	0,15
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	0,3	0,15
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	0,15	0,075
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	0,15	0,075

Bộ môi theo sáng chế bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-28 để nhân các đoạn chỉ thị STR đích trong gen F8 được nhân bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân tích di truyền đột biến gen F8 trên mẫu

Để thử nghiệm phân tích đột biến di truyền liên kết trên gen F8, tiến hành thử nghiệm với mẫu phôi thụ tinh trong ống nghiệm từ cặp vợ chồng có người mẹ mang gen F8 đột biến, người bố khỏe mạnh. Các mẫu được sử dụng là mẫu ADN được chiết từ mẫu máu của mẹ mang gen F8 đột biến (mẫu F), mẫu ADN được chiết từ mẫu máu của bố bình thường (mẫu M) và mẫu ADN được chiết từ mẫu máu của người cùng huyết thống với mẹ (em trai) bị mắc bệnh (mẫu P). Việc chiết ADN tổng số được thực hiện

bằng kit chiết ADN theo hướng dẫn của nhà cung cấp (kit QIAGEN blood Minikit) đạt độ tinh sạch (A260/A280 đạt từ 1,8 đến 2,0), sau khi chiết, ADN được pha loãng về nồng độ 10 ng/ml để làm khuôn trong PCR đa môi.

Mẫu phôi cần sàng lọc là phôi được thụ tinh trong ống nghiệm theo quy trình thụ tinh trong ống nghiệm chuẩn. Bốn mẫu phôi độc lập được sử dụng để sàng lọc (mẫu Q1, Q2, Q3 và Q4), mỗi phôi tiến hành tách lấy 1 tế bào khi phôi đạt 5 ngày tuổi và khuếch đại ADN bằng kit WGA (whole genome amplification: WGA) bằng kit REPLI-g Single Cell (QIAGEN, Đức) theo quy trình của nhà cung cấp. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarosa và đo nồng độ sản phẩm sau khuếch đại bằng máy đo Qubit 4.0 (Thermo), chuẩn độ ADN về nồng độ 10 ng/ml để làm khuôn trong PCR đa môi.

Lần lượt tiến hành PCR cho mẫu M, F, P, Q1, Q2, A3 và Q4 bằng PCR đa môi với thành phần như sau:

Thành phần		Gắn huỳnh quang	Nồng độ	Thể tích (μl/phản ứng)
HPLC H ₂ O				1,84
Multiplex MasterMix 2X			1X	10,00
Môi	SEQ ID NO.1	Xanh dương	0,25	0,1
	SEQ ID NO.2		0,25	0,1
	SEQ ID NO.3	Xanh lục	0,2	0,1
	SEQ ID NO.4		0,2	0,1
	SEQ ID NO.5	Không gắn	0,4	0,2
	SEQ ID NO.6		0,4	0,2
	SEQ ID NO.7	Xanh lục	0,2	0,1
	SEQ ID NO.8		0,2	0,1
	SEQ ID NO.9	Xanh lục	0,2	0,1
	SEQ ID NO.10		0,2	0,1
	SEQ ID NO.11	Xanh dương	0,2	0,1
	SEQ ID NO.12		0,2	0,1
	SEQ ID NO.13	Xanh dương	0,7	0,28
	SEQ ID NO.14		0,7	0,28
	SEQ ID NO.15	Không gắn	0,2	0,1

	SEQ ID NO.16		0,2	0,1
	SEQ ID NO.17	Không gắn	0,6	0,3
	SEQ ID NO.18		0,6	0,3
	SEQ ID NO.19	Xanh dương	0,4	0,2
	SEQ ID NO.20		0,4	0,2
	SEQ ID NO.21	Xanh lục	0,25	0,125
	SEQ ID NO.22		0,25	0,125
	SEQ ID NO.23	Không gắn	0,3	0,15
	SEQ ID NO.24		0,3	0,15
	SEQ ID NO.25	Xanh dương	0,3	0,15
	SEQ ID NO.26		0,3	0,15
	SEQ ID NO.27	Không gắn	0,15	0,075
SEQ ID NO.28	0,15		0,075	
	ADN khuôn			1,00
	Tổng thể tích			20,00

Tiến hành chu trình nhiệt gồm bước hoạt hóa enzym ban đầu ở 95⁰C trong 15 phút, 40 chu kỳ gồm biến tính ở 94⁰C trong 30 giây, gắn mồi ở 60⁰C trong 90 giây, kéo dài ở 72⁰C trong 1 phút và kéo dài thêm 6 giây sau mỗi chu kỳ và bước kéo dài cuối cùng ở 60⁰C trong 30 phút.

Sản phẩm PCR thu được lần lượt tiến hành điện di mao quản với thành phần phản ứng như sau: 10µl tổng thể tích bao gồm 8,5µl đệm điện di Hi-Di Formamit; 0,5µl GeneScan-500 LIZ và 1,0µl sản phẩm PCR. Chu trình nhiệt như sau: Biến tính ở 95⁰C trong 5 phút. Phân tích kết quả bằng phần mềm GeneMapper 5.0.

Kết quả điện di mao quản đối với các mẫu Q1, Q2, Q3 và Q4 được thể hiện trên các Hình 1-4, tương ứng. Kết quả phân tích di truyền liên kết dựa trên các chỉ thị STR trên gen F8 của mẫu được thể hiện trên Hình 5.

Từ bảng dữ liệu kích thước STR của gia đình trong sơ đồ phả hệ (tập hợp từ kết quả điện di mao quản) trên Hình 5, tiến hành phân tích di truyền liên kết:

- Mẫu Q1 không xuất hiện pic 145 bp của chỉ thị Amelogenin trên nhiễm sắc thể Y, như vậy phôi này nhận các STR trên một nhiễm sắc thể X di truyền từ mẫu M và

một nhiễm sắc thể X di truyền từ mẫu F. Ngoài các kích thước STR nhận từ mẫu M có kích thước giống với mẫu P (các đoạn không đột biến), bộ kích thước STR còn lại của mẫu Q1 này giống với bộ kích thước STR đột biến của mẫu P (nghĩa là mẫu Q1 này nhận một nhiễm sắc thể X mang gen đột biến từ mẫu F). Như vậy, với kết quả phân tích di truyền liên kết có thể kết luận là mẫu Q1 có mang gen F8 đột biến.

- Mẫu Q2 và Q3 không xuất hiện pic 145bp của chỉ thị Amelogenin trên nhiễm sắc thể Y, như vậy phôi này nhận các STR trên một nhiễm sắc thể X di truyền từ mẫu M và một nhiễm sắc thể X di truyền từ mẫu F. Ngoài các kích thước STR nhận từ mẫu M có kích thước giống với mẫu P (các đoạn không đột biến) thì bộ kích thước STR còn lại của mẫu Q2 và Q3 không giống với bộ kích thước còn lại của mẫu P. Như vậy, với kết quả phân tích di truyền liên kết có thể kết luận các mẫu Q2 và Q3 không mang gen F8 đột biến.

- Mẫu Q4 xuất hiện pic 145 bp của chỉ thị Amelogenin trên nhiễm sắc thể Y, như vậy phôi này nhận STR trên một nhiễm sắc thể X di truyền từ mẫu F và một nhiễm sắc thể Y di truyền từ mẫu F. Các kích thước STR nhận từ mẫu F có kích thước không giống với mẫu P. Như vậy, với kết quả phân tích di truyền liên kết có thể kết luận mẫu Q4 không mang F8 đột biến.

Như vậy, bằng cách PCR đa môi và đánh giá liên kết gen trên phôi 5 ngày tuổi có thể sàng lọc được đột biến di truyền trên gen F8. Cụ thể trong số 04 phôi được sàng lọc, có 01 phôi mang đột biến di truyền liên kết gen F8 là Q1 và 03 phôi không mang đột biến di truyền liên kết gen F8 là Q2, Q3 và Q4.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 theo sáng chế cho phép nhận đặc hiệu 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin có kích thước xác định, thuận lợi cho việc phân tích di truyền liên kết trong đánh giá đột biến gen F8 trên phôi. Quy trình cho phép xác định được đột biến di truyền liên kết thông qua tổ hợp của 13 đoạn chỉ thị STR gây đột biến trên gen F8, cho phép ứng dụng trong nghiên cứu di truyền trên phôi.

Bằng cách chọn lọc, tối ưu hóa các đoạn mồi đặc hiệu, tối ưu hóa các điều kiện PCR đa mồi, sáng chế cho phép sử dụng đồng thời tới 14 cặp mồi để thực hiện 1 phản ứng PCR đa mồi duy nhất để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 và 1 chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính. Từ đó, sáng chế cho phép rút ngắn thời gian nghiên cứu đột biến di truyền trên gen F8.

Bộ mồi dùng trong phản ứng PCR đa mồi để khuếch đại các đoạn chỉ thị của gen F8 theo sáng chế cho phép nhân đặc hiệu 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin với kết quả rõ ràng, chính xác, có khả năng phân biệt, xác định được kích thước sản phẩm, không xảy ra hiện tượng bắt cặp chéo, nhân không đặc hiệu góp phần vào việc xác định di truyền liên kết với sai số dưới 1%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình xác định trạng thái đột biến di truyền liên kết của gen F8 không nhằm mục đích chẩn đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, trong quy trình này bao gồm các bước:

a) xác định trạng thái đột biến gen F8 của mẹ bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu của mẹ và mẫu đối chứng thu được từ nam giới cùng huyết thống với mẹ bị đột biến gen F8, sau đó độc lập tiến hành PCR đa mồi với bộ mồi để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin, sau khi điện di mao quản, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu ADN của mẹ và mẫu ADN đối chứng để xác định trạng thái đột biến của gen F8 của mẹ;

b) xác định trạng thái đột biến gen F8 của phôi thụ tinh trong ống nghiệm với bố bằng cách chiết ADN từ mẫu máu của bố và mẫu phôi 5 ngày tuổi cần xác định trạng thái đột biến gen F8, sau đó tiến hành PCR đa mồi với bộ mồi để nhân 13 đoạn chỉ thị STR trên gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin, sau khi điện di mao quản, so sánh kích thước các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu của bố với mẫu phôi để xác định trạng thái đột biến gen F8 di truyền của phôi với bố;

c) kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi bằng cách phân tích di truyền liên kết của tổ hợp các đoạn chỉ thị STR thu được từ mẫu của bố, mẹ, mẫu đối chứng với các đoạn chỉ thị STR thu được từ phôi, căn cứ vào kích thước của các đoạn chỉ thị STR đột biến xuất hiện trên phôi để kết luận về trạng thái đột biến di truyền liên kết gen F8 của phôi;

trong đó khác biệt ở chỗ bộ mồi dùng trong mỗi phản ứng PCR đa mồi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính bằng PCR đa mồi đối với các mẫu ADN thu được từ bố, mẹ, đối chứng và phôi bao gồm:

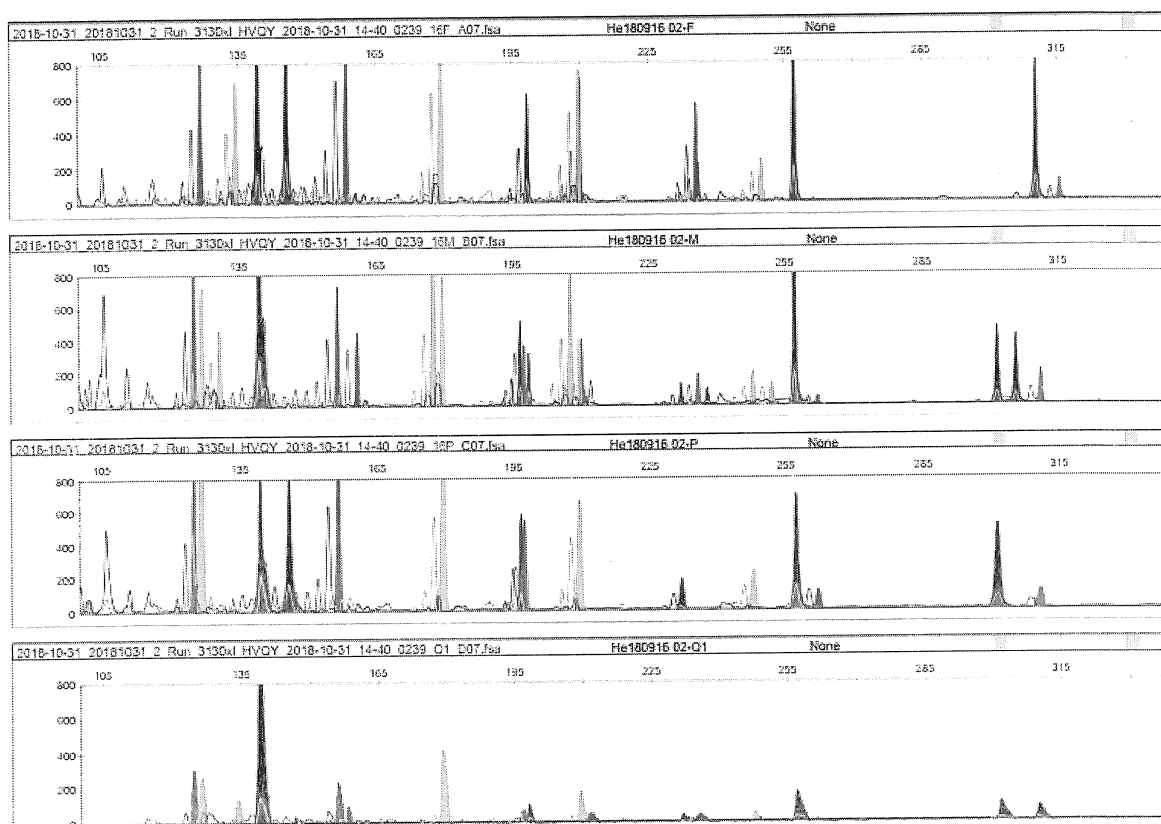
SEQ ID NO	Trình tự	Nồng độ (ng)	Thể tích (μ l)
1	GGTTTTCCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCG AGTTATTAC	0,25	0,1

2	GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC	0,25	0,1
3	GTAAAACGACGGCCAGTGGAAAATTCTCCTC TCCTGCTCC	0,2	0,1
4	CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG	0,2	0,1
5	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTC TTGGTCTGGC	0,4	0,2
6	GTTTCTCCCATTTCTATTCCTAAATAAGATAGC	0,4	0,2
7	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGC AGACTCC	0,2	0,1
8	GTTTCCTTTAGAAATCACTCTTGGTGTG	0,2	0,1
9	GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCT ATCCTCC	0,2	0,1
10	GTCAAGGTGTCAAATCCCACG	0,2	0,1
11	GGTTTTCCCAGTCACGACCCACTACCAAATC ATTGAGCC	0,2	0,1
12	GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC	0,2	0,1
13	GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAAACCTGA ACAAC TAGAAGG	0,7	0,28
14	AATCTGGATGGCTTCAAGCTC	0,7	0,28
15	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACT TTTACCATTGGC	0,2	0,1
16	GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC	0,2	0,1
17	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTTTCAG ATCACTTCTTTC	0,6	0,3
18	GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC	0,6	0,3
19	GGTTTTCCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTC AGCCCC	0,4	0,2
20	GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC	0,4	0,2
21	GTAAAACGACGGCCAGTGCTGTCTGATACAA CTGCTGATAC	0,25	0,125
22	GGGTTAGTGGTACTCAAACAC	0,25	0,125
23	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGT GTCACTG	0,3	0,15
24	GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC	0,3	0,15
25	GGTTTTCCCAGTCACGACGGATTCCAGTGAC ATTGACTCTATC	0,3	0,15
26	GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG	0,3	0,15

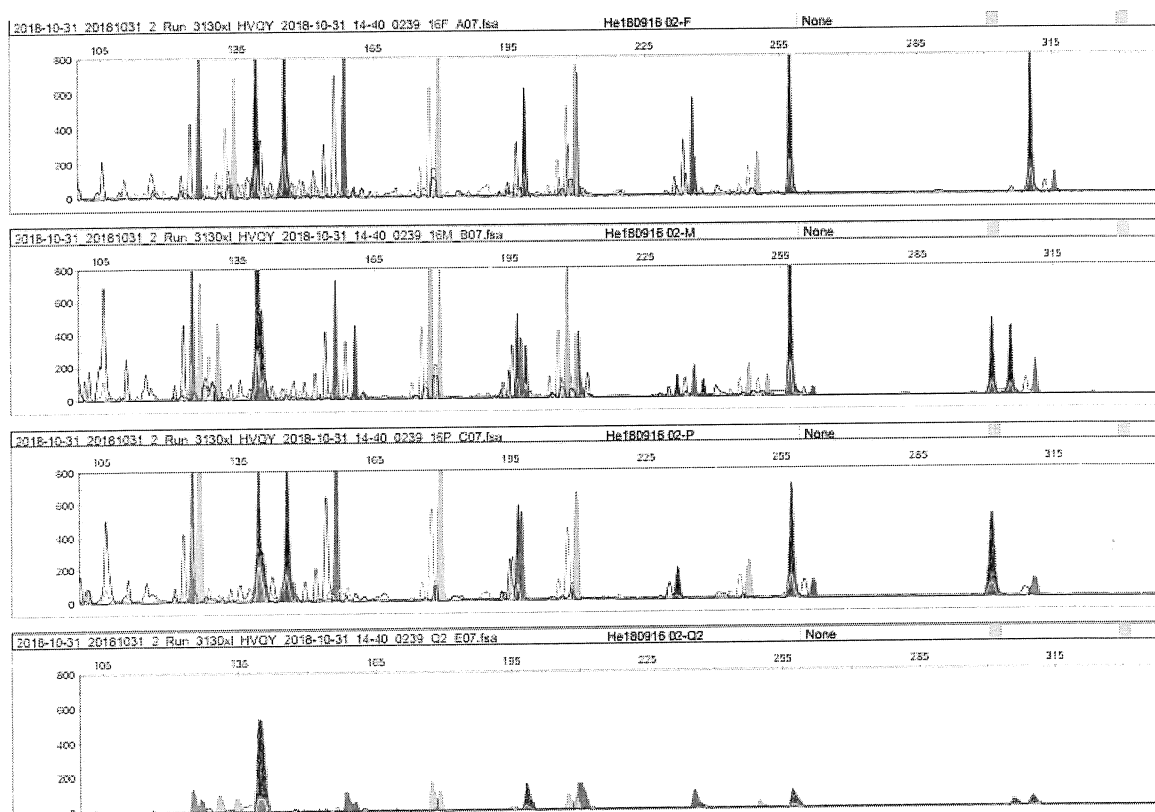
27	CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGT AAAGAATAGTG	0,15	0,075
28	GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG	0,15	0,075

để nhân đồng thời 13 đoạn chỉ thị STR của gen F8 bao gồm DXS1073, REN90682, REN90833, F8Int25.2, F8Int22, F8Int21, F8Int13.2, F8Int1, stSG604486, HEMA154130.5, THLMEInt2, THLMEInt1.1, HEMA154498.9 và đoạn chỉ thị nhiễm sắc thể giới tính amelogenin.

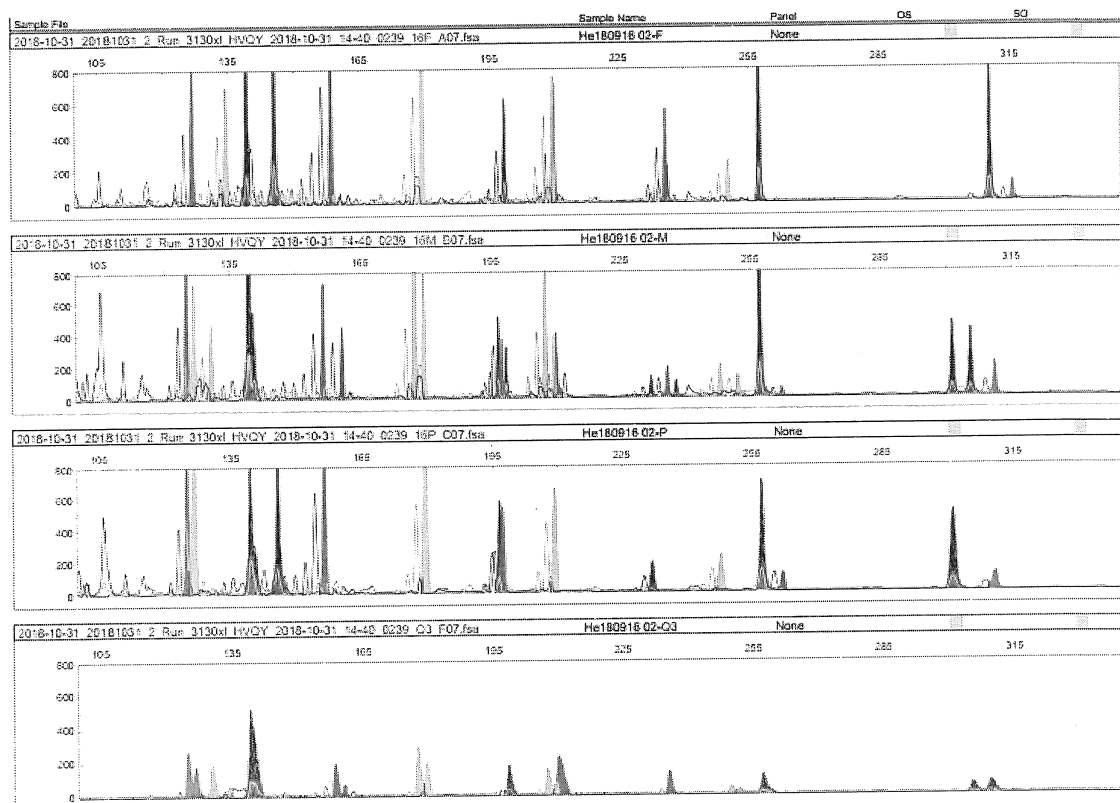
HÌNH 1



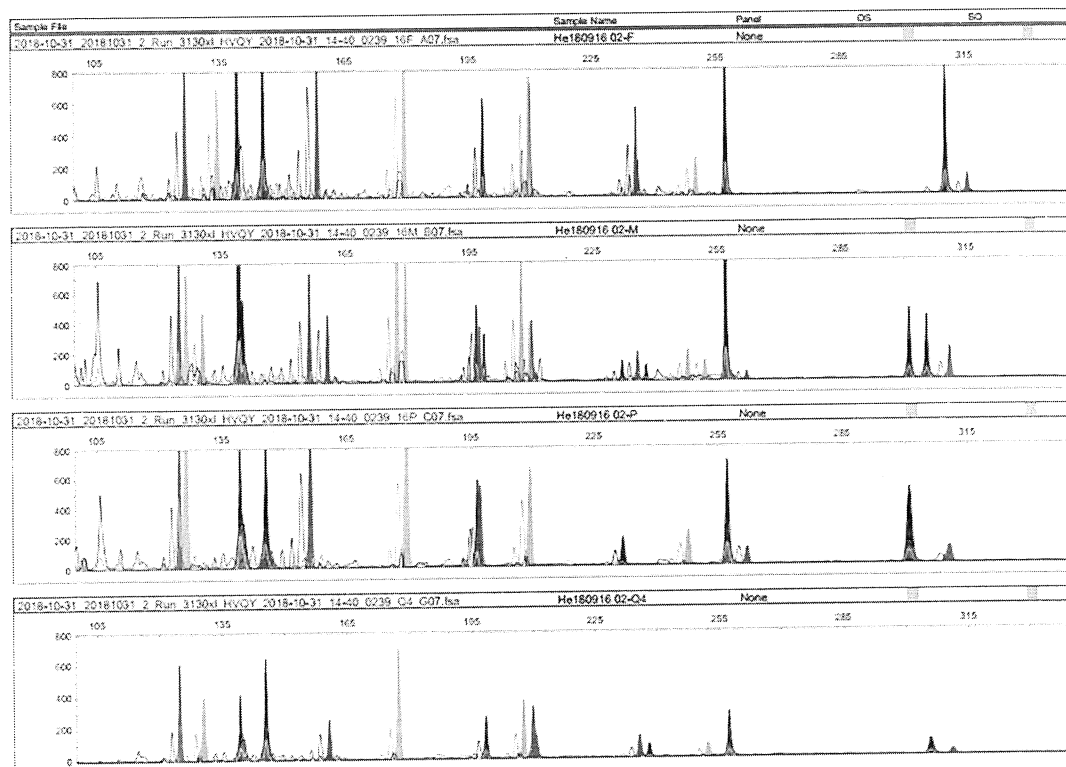
HÌNH 2



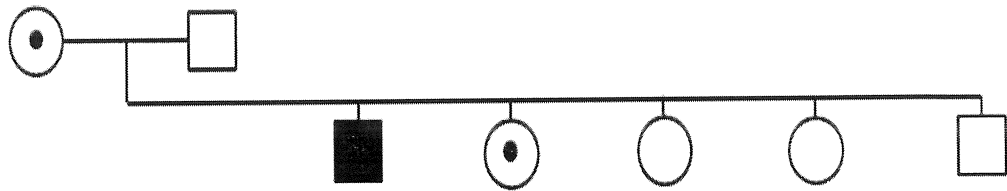
HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5



STR	M		F	P		Q1		Q2		Q3		Q4	
F8Int21	125.1	125.1	126.7	124.9		124.7	ADO	124.8	126.6	124.7	126.7	124.7	
DXS1073	156.3	160.8	158.4	156.3		156.1	158.3	160.4	158.3	160.6	158.5	160.6	
HEMA154130.5	197.3	210.1	209.9	197.3		196.7	ADO	209.8	209.8	210.1	210.1	209.8	
HEMA154498.9	262.1	235.7	235.6	262		ADO	235.4	235.3	235.3	235.6	235.6	235.5	
F8Int13.2	311	311	315.5	310.5		ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	ADO	311.1	
REN90682	126.7	130.7	134.4	126.6		126.4	134.4	130.6	134.5	130.4	134.4	130.5	
F8Int25.2	179.5	177.4	179.4	179.4		179.2	179.2	177.3	179	177.5	179.5	177.2	
F8Int22	209.5	207.5	209.5	209.4		209.4	209.4	207.3	209.2	207.4	209.3	207.4	
THLMEInt2	247.9	252	250	247.7		247.8	ADO	ADO	249.8	251.8	249.7	252	
Amelogenin	139.3	139.3	139.2 145.4	139.4	146	139.2	139.2	139.4	139.4	139.2	139.2	139.1	145.3
F8Int1	196.6	198.4	198.4	196.6		ADO	197.9	198.1	198.1	198.4	198.4	198.3	
stSG604486	232	237.8	236	231.8		231.8	235.6	ADO	ADO	ADO	ADO	237.9	
REN90833	257	257	257.2	257.1		257	257	257.1	257.1	257	257	257.1	
THLMEInt1 1	301.2	305.5	310.2	300.9		301.6	310.2	305.5	309.8	305.1	309.3	305.7	

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Đặng Tiến Trường, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Duy Bắc, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Văn Điều, Trần Ngọc Anh

<120> Bộ mỗi dùng trong phản ứng PCR đa mỗi để khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của gen F8

<130>

<160> 30

<170>

<210> 1

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 1

GGTTTTCCAGTCACGACGAATGCCCTCTCCGAGTTATTAC

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

GTTTCTGAGATTGGTGGCCTTTGAAAC

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 3

GTAAACGACGGCCAGTGGAATTCCTCTCCTGCTCC

<210> 4

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 4
CCTTCTTTCTTCAAATGATGCTTGG

<210> 5
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 5
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGTCAATATGTCTTGGTCTGGC

<210> 6
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 6
GTTTCTCCCATTCCTATTCTAAATAAGATAGC

<210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 7
GTAAACGACGGCCAGTGCTTGAGACTTGGCAGACTCC

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 8
GTTTCCTTTAGAAATCACTCTTGGTGTG

<210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 9
GTAAAACGACGGCCAGTGGAATGCACAGCCTATCCTCC

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 10
GTCAAGGTGTCAAATCCCACG

<210> 11
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 11
GGTTTTCCAGTCACGACCCACTACCAAATCATTGAGCC

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 12
GGTCCATTAGCTTATGTGAGTC

<210> 13
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 13
GGTTTTCCCAGTCACGACTCAACAAAAGTGAACAAGTAGAAGG

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 14
AATCTGGATGGCTTCAAGCTC

<210> 15
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 15
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGACCCTGTACTTTTACCATTGGC

<210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 16
GTTTCTCAGCAACTCGACTTCTGGC

<210> 17
<211> 44
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 17
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGGCAATTCAGATCACTTCTTTC

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 18
GTTTGTTACGGTTTTCTTTGTGGC

<210> 19
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 19
GGTTTTCCAGTCACGACAATCTATGTGAGTCAGCCCC

<210> 20
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 20
GTTTCTCAAGTAGAAAAGTCCTGTGGC

<210> 21
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 21
GTAAAACGACGGCCAGTGTCTGTCTGATACAACTGCTGATAC

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 22
GGGTTAGTGGTACTCAAACAC

<210> 23
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 23
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGGCTGCAACTGTGTCACTG

<210> 24
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 24
GTTTCCCTACTGTCTTGACTATTGTGGC

<210> 25
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 25
GGTTTTCCAGTCACGACGGATTCCAGTGACATTGACTCTATC

<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 26
GTATCTACTGTTACATGGACTTGGG

<210> 27
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 27
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG

<210> 28
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 28
GTTTCTCAACCATCAGAGCTTAAACTGG