



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

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

(11)



2-0004035

(51) **C12Q 1/68**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00225

(22) 02/06/2022

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/08/2022 413A

(71) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

(72) Nguyễn Thị Vân Anh (VN); Bùi Thị Việt Hà (VN); Bùi Thị Huyền (VN); Chu Văn Sơn (VN).

(54) **KIT ĐỂ XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH LÂY TRUYỀN QUA ĐƯỜNG
TÌNH DỤC VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KIT NÀY**

(21) 2-2022-00225

(57) Sáng chế đề cập đến kit để phát hiện 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến bao gồm cả vi khuẩn, virus, nấm và kí sinh trùng. Bằng cách thiết kế và tối ưu các đoạn môi, mẫu dò kit cải tiến gắn chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotide thứ 9 của mẫu dò cho phép nhận đặc hiệu trình tự ADN đích của 9 tác nhân gây bệnh với tín hiệu nền thấp và tăng độ nhạy của kit. Kit theo sáng chế cho phép đơn giản hóa quy trình xét nghiệm để phát hiện cũng như sàng lọc sớm các tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kit này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh và di truyền học, cụ thể là đề cập đến kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục và quy trình sản xuất kit, bộ mồi và bộ dò đặc hiệu cho 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh lây truyền qua đường tình dục (Sexually transmitted diseases – STD) là một trong những nhiễm trùng cơ hội phổ biến nhất. Tỷ lệ nhiễm bệnh ở các vùng, các quốc gia là khác nhau, tỷ lệ nhiễm bệnh ở nước đang phát triển cao gấp 20 lần các nước phát triển. Thống kê cho thấy có hơn 30 loại vi khuẩn, virus và ký sinh trùng khác nhau được biết là nguyên nhân gây bệnh. *Neisseria gonorrhoeae* hay vi khuẩn lậu cầu là nguyên nhân chính gây bệnh lậu. Bằng cách lan truyền trong dịch, bắt đầu từ niêm mạc niệu đạo hoặc nội mạc cổ tử cung, lậu cầu có thể gây nhiễm trùng tăng dần dẫn đến viêm mào tinh hoàn, viêm vòi trứng và bệnh viêm vùng chậu. Ngoài ra, nhiễm *Neisseria gonorrhoeae* trong thai kỳ có liên quan đến kết quả thai nghén bất lợi, trẻ sơ sinh nhẹ cân, nhỏ so với tuổi thai và lây truyền sang trẻ sơ sinh có thể dẫn đến viêm kết mạc (nhiễm trùng mắt ở trẻ sơ sinh) và nhiễm trùng hầu họng. *Gardnerella vaginalis* và nấm *Candida albicans* là một trong những tác nhân gây viêm âm đạo phổ biến nhất. Người bệnh nhiễm *Gardnerella vaginalis* thường có các triệu chứng: dịch tiết trắng hoặc xám, có mùi tanh phũ trên thành âm đạo. Nhiễm khuẩn âm đạo do *Gardnerella* làm tăng nguy cơ viêm vùng chậu, nếu có thai sẽ dễ bị vỡ ối non, nhiễm trùng ối, sinh non, viêm nội mạc tử cung sau sinh và sau mổ lấy thai. Nhiễm nấm *Candida* phụ khoa, phụ nữ sẽ có triệu chứng ngứa, tấy đỏ, nóng rát vùng âm đạo đặc biệt là khi tiểu tiện. Khi quan hệ tình dục sẽ rất đau và khó chịu. Dịch tiết từ âm đạo thường trắng đục và vón cục. Vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* gây ra bệnh nhiễm Chlamydia là bệnh lây truyền qua đường tình dục thường gặp, bệnh có thể dẫn đến các biến chứng ảnh hưởng đến niệu

đạo cổ tử cung, tử cung và tuyến tiền liệt và thậm chí có thể dẫn tới vô sinh. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) gây mụn rộp quanh miệng và Herpes simplex virus 2 (HSV-2) gây mụn rộp sinh dục, nhưng cả hai đều có khả năng lây nhiễm sang vùng sinh dục. *Trichomonas vaginalis* là một loại trùng roi ký sinh ở đường sinh dục người, nhiễm trùng có thể để lại các biến chứng nghiêm trọng, đặc biệt là phụ nữ mang thai; có thể gây viêm âm đạo, viêm cổ tử cung và viêm niệu đạo, viêm vùng chậu, vỡ ối sớm, sinh non sốt hậu sản kéo dài ở phụ nữ mang thai, viêm mào tinh hoàn, viêm tuyến tiền liệt ở nam giới. *Mycoplasma hominis* và *Mycoplasma genitalium* có thể gây viêm đường tiết niệu, viêm vùng chậu, sốt hậu sản, nhiễm trùng âm đạo do nhiễm vi khuẩn, nhiễm trùng ngoại vi ở người bị suy giảm miễn dịch, nhiễm trùng xâm lấn ở các nhóm dễ bị tổn thương. Bệnh lây truyền qua đường tình dục nếu không điều trị hoặc điều trị không đúng, không kịp thời có thể gây các biến chứng như viêm vùng chậu, vô sinh, mang thai ngoài tử cung, sảy thai, ung thư cổ tử cung và các biến chứng nguy hiểm cho thai nhi. Đây được coi là một vấn đề lớn đang rất được quan tâm vì những thiệt hại về kinh tế do bệnh gây ra là rất lớn, những gánh nặng về y tế, cũng như những vấn đề về gia đình, xã hội.

Một số tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục được chữa khỏi bằng cách điều trị kháng sinh phù hợp. Tuy nhiên, hầu hết các tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục đều có các triệu chứng không điển hình, rất khó chẩn đoán. Hiện nay, phương pháp chẩn đoán các bệnh lây truyền qua đường tình dục theo tiêu chuẩn Amsel, hay các tiêu chí Nugent dựa trên các triệu chứng lâm sàng như màu, mùi dịch âm đạo, và các phương pháp vi sinh thông thường như nuôi cấy phân lập, nhuộm gram hoặc soi tươi còn tồn đọng nhiều nhược điểm. Trên thực tế, các phương pháp này chỉ đánh giá được sự xuất hiện của tác nhân gây bệnh, mà không xác định được chính xác từng loài, cũng như không cho phép định lượng chính xác lượng mầm bệnh trên một đơn vị mẫu. Để có liệu pháp điều trị tốt nhất cho bệnh nhân, đầu tiên là phải chẩn đoán chính xác tác nhân gây bệnh.

Với những tiến bộ của sinh học phân tử trong lĩnh vực chẩn đoán đã có nhiều kỹ thuật và bộ kit thương mại trên thế giới được nghiên cứu phát triển để phát hiện đồng thời một số tác nhân gây nhiễm trùng đường âm đạo. Hai kỹ thuật phổ biến nhất được phát triển là realtime-PCR và ADN mini chip (PCR kết hợp phản ứng lai ADN).

Với kỹ thuật realtime-PCR, có rất nhiều hãng đã phát triển các kit phát hiện từng loài vi sinh vật đơn lẻ gây nhiễm trùng âm đạo, ví dụ hãng Geneproof (Brno-jih, Czech) với kit PCR như GeneProof *Chlamydia trachomatis* PCR Kit, GeneProof *Neisseria gonorrhoeae* PCR Kit, GeneProof *Trichomonas vaginalis* PCR Kit, GeneProof *Mycoplasma genitalium/hominis* PCR Kit, GeneProof Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) PCR Kit. Hãng Norgen Biotek có sản xuất kit phát hiện *Candida albicans* có tên “Candida albicans Detection Kits”. Tính đến tháng 5/2013 có 5 công ty ở Mỹ đã phát triển kit thương mại phát hiện đồng thời cả *C. trachomatis* và *N. gonorrhoeae* bằng phương pháp realtime-PCR bao gồm Abbott RealTime m2000 CT/NG (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, Illinois), Amplicor and cobas CT/NG test (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, New Jersey); Aptima Combo 2 Assay for CT/NG (Hologic/Gen-Probe, San Diego, California); BD ProbeTec ET and Qx (Becton Dickinson, Sparks, Maryland), và Xpert CT/ NG Assay (Cepheid, Sunnyvale, California) (Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. (2014) Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63, 1-19). Bên cạnh có, nhiều công ty cũng phát triển các kit đa môi khác để phát hiện từ ba tác nhân trở lên, có thể kể đến là:

- kit phát hiện 3 tác nhân “VIASURE *C. albicans*, *G. vaginalis* & *T. vaginalis* Real Time PCR Detection Kit” của hãng CerTest Biotec (Tây Ban Nha);

- kit phát hiện 7 tác nhân “VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection” của hãng CerTest Biotec (Tây Ban Nha) phát hiện 7 tác nhân bao gồm: *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *U. parvum* and/or *M. hominis*. của hãng CerTest Biotec, kit “Allplex™ STI Essential Assay Q” của Seegene (Hàn Quốc) phát hiện 7 tác nhân: *Chlamydia trachomatis* (CT); *Mycoplasma genitalium* (MG); *Mycoplasma hominis* (Quantitative) (MH); *Neisseria gonorrhoeae* (NG); *Trichomonas vaginalis* (TV); *Ureaplasma parvum* (UP); *Ureaplasma urealyticum* (Quantitative) (UU);

- kit “FTD STD9” của hãng Fast Track Diagnostic (Luxembourg) phát hiện được 9 tác nhân: *C. trachomatis*; *N. gonorrhoeae*; *M. genitalium*; *T. vaginalis*; *U. urealyticum/parvum*; *G. vaginalis*; herpes simplex viruses 1/2;

- kit “Allplex™ STI/BV Panel Assays” của hãng Seegene (Hàn Quốc) phát hiện 28 loại vi khuẩn virus và nấm bao gồm hầu hết các tác nhân gây viêm nhiễm đường sinh dục ở người.

Nhìn chung, phần lớn các kit theo nguyên lý realtime-PCR do nhằm phát hiện một số tác nhân gây bệnh hiệu quả, có công bố hợp chuẩn sử dụng trong y tế. Tuy nhiên, các kit này có giá thành cao và không phát hiện được đồng các tác nhân gây bệnh bao gồm cả vi khuẩn, vi nấm, virus và ký sinh trùng gây bệnh nguy hiểm phổ biến tại các nước Đông Nam Á nói chung và Việt Nam nói riêng, cụ thể là không có kit nào cho phép phát hiện được 9 tác nhân gây bệnh nguy hiểm bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Với kỹ thuật ADN mini chip phối hợp giữa phản ứng PCR nhân đoạn gen đặc hiệu cho từng tác nhân sử dụng môi gắn biotin sau đó tiến hành phản ứng lai với các đoạn dò đặc hiệu trên mini chip, có một vài nhóm nghiên cứu và hãng sản xuất đã phát triển các kit phát hiện nhiều tác nhân gây bệnh đường âm đạo. Điển hình là chip GenoFlow STD array test kit của hãng Diagcor, Hồng Kông phát hiện được 11 tác nhân gây bệnh gồm *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG), *M. genitalium* (MG), *U. urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP), *T. vaginalis* (TV), *M. hominis* (MH), HPV type 6, HPV type 11, Herpes simplex virus type 1, Herpes simplex virus type 2. Tuy nhiên, chip này không được công bố rõ ràng về ngưỡng phát hiện phát hiện cũng như độ chính xác, độ đặc hiệu của xét nghiệm trong việc phát hiện từng loài vi sinh vật gây bệnh nên vẫn có thể dẫn đến tình trạng âm tính, dương tính giả, gây khó khăn cho các bác sĩ trong điều trị bệnh.

Nhu cầu xét nghiệm chuẩn đoán các tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục rất cao, tuy nhiên chưa có chưa có công ty nào sản xuất bộ kit phát hiện được đồng thời ba hay bốn tác nhân gây nhiễm trùng đường âm đạo phổ biến ở Việt Nam. Vì vậy, các khoa xét nghiệm thuộc các bệnh viện tuyến Trung ương (như bệnh viện Phụ Sản Trung ương, Bệnh viện Bạch Mai) và tuyến thành phố/tỉnh (Bệnh viện phụ sản Hà Nội, Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Bắc Ninh...) hiện vẫn sử dụng các kit nhập ngoại có giá thành cao, nhưng các loài vi sinh vật có khả năng phát hiện được bằng các kit này lại không hoàn toàn bao phủ được các tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến. Ngoài ra, việc nhiễu do tín hiệu nền lớn, nhất là trong các mẫu có lẫn các lợi

khuẩn hoặc vi khuẩn không gây bệnh khác nên bị giới hạn về độ đặc hiệu cũng như khó khăn trong việc xác định tín hiệu nền, đặc biệt ở những mẫu có tải lượng thấp.

Do đó, vẫn cần nhu cầu phát triển kit phát hiện các tác nhân gây bệnh qua đường tình dục, cụ thể cần kit cho phép phát hiện được 9 tác nhân gây bệnh nguy hiểm phổ biến bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* với độ đặc hiệu và giảm được tín hiệu nền nhiều.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, bằng cách thiết kế các môi, đoạn dò cũng như sử dụng các đầu dò Taqman gắn chất hấp phụ huỳnh quang ZEN, TAO ở giữa trình tự để giảm tín hiệu nền cho phép giảm được tín hiệu nền giúp phát hiện được đồng thời 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến nhất ở Việt Nam, bao gồm cả vi khuẩn, vi nấm, virus và ký sinh trùng, cụ thể sáng chế đề xuất kit để xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*, phương pháp sản xuất kit này, bộ môi và bộ đầu dò dùng trong kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó kit này bao gồm các dung dịch MX1, MX2, MX3 và PC với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Môi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Môi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Môi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Môi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Môi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Môi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Môi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó: plasmit PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmit PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmit PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmit PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmit PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmit PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmit PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmit PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmit PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmit IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các đầu dò độc lập có trong các dung dịch MX1, MX2, MX3 có đầu 5' được gắn chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo các plasmit tái tổ hợp bằng cách phân lập từ *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2), *Mycoplasma genitalium* (MG) và beta-actin có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 rồi nối vào plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 và biến nạp vào tế bào *E.coli*, sau khi nuôi cấy, chiết tách thu được 10 loại plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 được ký hiệu là PC_GV (chứa SEQ ID NO.82), PC_NG (chứa SEQ ID NO.83), PC_CT (chứa SEQ ID NO.84), PC_HSV1 (chứa SEQ ID NO.85), PC_CA (chứa SEQ ID NO.86), PC_TV (chứa SEQ ID NO.87), PC_MH (chứa SEQ ID NO.88), PC_HSV-2 (chứa SEQ

ID NO.89), PC_MG (chứa SEQ ID NO.90), IC-actin (chứa SEQ ID NO.91), các plasmit này được định lượng đến 10^6 plasmit/ μ l;

b) tổng hợp các đoạn mồi độc lập cho mỗi cặp mồi GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin và chuẩn độ mỗi đoạn mồi này đến nồng độ 100 pmol/ μ l, trong đó:

- cặp mồi GV bao gồm mồi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mồi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6;

- cặp mồi NG bao gồm mồi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mồi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15;

- cặp mồi CT bao gồm mồi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mồi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24;

- cặp mồi HSV-1 bao gồm mồi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mồi ngược HSV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33;

- cặp mồi CA bao gồm mồi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mồi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42;

- cặp mồi TV bao gồm mồi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và mồi ngược TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51;

- cặp mồi MH bao gồm mồi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và mồi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60;

- cặp mồi HSV-2 bao gồm mồi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mồi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66;

- cặp mồi MG bao gồm mồi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và mồi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75; và

- cặp mồi beta-actin bao gồm mồi xuôi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mồi ngược beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80;

c) tổng hợp các đầu dò độc lập GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin và gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò và chuẩn độ mỗi đầu dò này đến 10 pmol/μl, trong đó:

- đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9;

- đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18;

- đầu dò CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27;

- đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36;

- đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45;

- đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54;

- đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63;

- đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69;

- đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78; và

- đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81; và

d) tạo kit bằng cách tạo ra các dung dịch MX1, MX2, MX3 và PC với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Mồi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và
		Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Mồi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và
		Mồi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và
		Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Mồi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và
		Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Mỗi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mỗi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Mỗi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		plasmit PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmit PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmit PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmit PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmit PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmit PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmit PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmit PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmit PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmit IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91;

các dung dịch này được đóng trong các lọ độc lập, thu được kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ mỗi dùng trong kit theo sáng chế, trong đó bộ mỗi này bao gồm các cặp mỗi GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin, trong đó:

- cặp mỗi GV bao gồm mỗi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mỗi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6;

- cặp mỗi NG bao gồm mỗi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mỗi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15;

- cặp mỗi CT bao gồm mỗi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mỗi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24;

- cặp mỗi HSV-1 bao gồm mỗi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mỗi ngược HSV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33;

- cặp mỗi CA bao gồm mỗi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mỗi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42;

- cặp mỗi TV bao gồm mỗi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và mỗi ngược TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51;

- cặp mỗi MH bao gồm mỗi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và mỗi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60;

- cặp mỗi HSV-2 bao gồm mỗi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mỗi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66;

- cặp mỗi MG bao gồm mỗi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và mỗi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75; và

- cặp mỗi beta-actin bao gồm mỗi xuôi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mỗi ngược beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến bộ đầu dò dùng trong kit theo sáng chế bao gồm đầu dò GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin, trong đó đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9; đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18; đầu dò CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27; đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36; đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ

ID NO.45; đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54; đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63; đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69; đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78; và đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả realtime-PCR của mẫu thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương và đối chứng âm, không thu được tín hiệu của cả kênh FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu kênh HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu kênh Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) cho mẫu âm tính với cả ba tác nhân HSV-1, CA và TV.

Hình 2 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với HSV-1 (tín hiệu FAM).

Hình 3 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với CA (tín hiệu FAM).

Hình 4 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với TV (tín hiệu Cy5).

Hình 5 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với CA (tín hiệu HEX);

01 mẫu dương tính đồng thời với cả hai tác nhân HSV-1 (tín hiệu FAM) và CA (tín hiệu HEX).

Hình 6 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân GV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) và không thu được tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân NG/CA/HSV-2), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân CT/TV/MG) của các mẫu bệnh phẩm dương tính với GV.

Hình 7 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) và không thu được tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân NG/CA/HSV-2), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân CT/TV/MG) của các mẫu bệnh phẩm dương tính với CA.

Hình 8 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu Texas Red phát hiện gen nội chuẩn beta-actin và không thu được tín hiệu của cả kênh FAM (đặc trưng cho tác nhân GV/HSV-1/MH), tín hiệu kênh HEX (đặc trưng cho tác nhân NG/CA/HSV-2), tín hiệu kênh Cy5 (đặc trưng cho tác nhân CT/TV/MG) cho các mẫu ADN dương tính với các tác nhân gây bệnh/lợi khuẩn thường thấy ở đường sinh dục của phụ nữ bao gồm: 01 mẫu *Echerichia coli* VTCC 12272, 01 mẫu *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12284, 01 mẫu *Lactobacillus plantarum* VTCC 10936, 01 mẫu *Bacillus subtilis* VTCC 11010, 01 mẫu *Bacillus coagulans* VTCC 11111.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích bộc lộ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Kit theo sáng chế được phát triển trên kỹ thuật PCR để khuếch đại các gen đặc trưng đối với từng tác nhân gây bệnh. Các hóa chất, thiết bị liên quan đến việc thiết kế, tổng hợp môi cũng như các dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza là các thành phần được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành hoặc được cung cấp bởi các nhà cung cấp hóa chất trên thị trường. Các thành phần này, trừ khi có quy định cụ thể khác, là những thành phần đã biết bất kỳ đáp ứng các tiêu chuẩn trong kỹ thuật PCR. Ví dụ, (i) dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza có thể mua được từ các nhà cung cấp, ví dụ Qiagen (Hoa Kỳ), Promega (Hoa Kỳ), Thermo Fisher Scientific (Hoa

Kỳ), Enzymomics (Hàn Quốc); (ii) các chất phát huỳnh quang để gắn vào đầu 5' của các trình tự axit nucleic làm đầu dò bao gồm: Fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexaclorofluorescein (HEX), 5'-Tetraclorofluorescein (TET), 6-carboxy-4',5'-dicloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (Yellow555), 6-carboxy-X-rhodamin (ROX), sulforhodamin 101 axit clorit (Texas Red), Fluor Red 610 Amidit (Red610), Cyanine-5 (Cy5), và chất hấp thụ huỳnh quang được gắn vào đầu 3' của các trình tự axit nucleic làm đầu dò bao gồm IBFQ (Iowa black fluorescence quencher) và BHQ1/2 (Black Hole Quencher 1 hoặc 2) có thể được mua từ IDT (Integrated DNA Technology, US). Ngoài ra, các đoạn mồi cũng như các đoạn dò có thể được tổng hợp hóa học bởi các công ty sinh hóa theo đặt hàng như IDT (Hoa Kỳ), Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ) hoặc công ty Phù Sa Biochem (Việt Nam).

Các plasmit được sử dụng để làm plasmit tái tổ hợp là plasmit thích hợp bất kỳ, có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2, các kỹ thuật nhân dòng, biến nạp đoạn gen mong muốn vào các plasmit này có thể thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Ví dụ, plasmit pUC19 là vector được tạo ra bởi Joachim Messing và cộng sự là dạng ADN sợi kép hình tròn có 2686 cặp bazơ. pUC19 có đoạn đầu N của gen β -galactosidaza (lacZ) của *E. coli* gồm nhiều vị trí cắt enzym giới hạn HindIII, SphI, PstI, Sali, XbaI, BamHI, SmaI, KpnI, SmaI và EcoRI và gen kháng ampicillin (mp R) cho phép biến nạp vào *E.coli* và chọn lọc trên môi trường thạch chứa ampicilin bổ sung IPTG và X-gal với khuẩn lạc màu trắng.

Các đầu dò huỳnh quang được sử dụng theo sáng chế được thiết kế dựa trên việc phát huỳnh quang và dập tắt huỳnh quang gắn với các đoạn dò đặc hiệu cho mỗi đoạn gen đặc hiệu của sinh vật đích. Ví dụ, đầu 5' của mẫu dò có gắn chất phát huỳnh quang FAM, HEX, Texas Red, hoặc Cy5 với các bước sóng kích thích/phát xạ tương ứng là 495/520 nm; 540/570 nm; 580/604 nm; 650/670 nm, có thể phân biệt độc lập trên 4 kênh màu huỳnh quang của máy PCR định lượng; trong khi đó đầu 3' của các mẫu dò có gắn IBFQ là chất hấp thụ được cả 4 loại huỳnh quang này và không phát ra tín hiệu. Ngoài ra, trong trình tự của mẫu dò còn có gắn thêm 1 chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 giúp khoảng cách giữa các đầu phát huỳnh quang và đầu dập tắt huỳnh quang được thu hẹp giúp giảm tín hiệu nền cho phản ứng real-time PCR đa mồi của kit theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để xác định tá nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó kit này bao gồm các dung dịch được ký hiệu MX1, MX2, MX3 và PC.

Dung dịch MX1 là dung dịch dùng trong phản ứng PCR, trong đó dung dịch này bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza và còn chứa cặp mồi GV, NG, CT và beta-actin, đầu dò GV, NG, CT và beta-actin.

Cặp mồi GV bao gồm mồi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mồi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 sau:

Mồi xuôi GV	Số trình tự
GCCATTCTTGATGCCAAT	SEQ ID NO.1
GCCATTCTTGATGCCAATCG	SEQ ID NO.2
AAGCCATTCTTGATGCCAATCGA	SEQ ID NO.3
Mồi ngược GV	Số trình tự
GGTGTTGATTGGGAGCTTA	SEQ ID NO.4
GGGTGTTGATTGGGAGCTTA	SEQ ID NO.5
GGGTGTTGATTGGGAGCTTACC	SEQ ID NO.6

Cặp mồi GV cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis* có kích thước khoảng 102 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò GV được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis*. Nồng độ đầu dò GV trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9 sau:

Đầu dò GV	Số trình tự
TGTGTTACCATCTCCGGTCGTGGT	SEQ ID NO.7
TGTGTTACCATCTCCGGTCGTGGT	SEQ ID NO.8
TGTGTTACCATCTCCGGTCGTGGTA	SEQ ID NO.9

Đầu dò GV được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi NG bao gồm mồi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mồi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15 sau:

Mồi xuôi NG	Số trình tự
AGCATTCAATTTGTTCCGAGTC	SEQ ID NO.10
CAGCATTCAATTTGTTCCGAGTC	SEQ ID NO.11
CAGCATTCAATTTGTTCCGAGTCA	SEQ ID NO.12
Mồi ngược NG	Số trình tự
CGGAACTGGTTTCATCTGATTA	SEQ ID NO.13
CGGAACTGGTTTCATCTGATTAC	SEQ ID NO.14
CGGAACTGGTTTCATCTGATTACT	SEQ ID NO.15

Cặp mồi NG cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *porA pseudogene* của *Neisseria gonorrhoeae* có kích thước khoảng 95 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò NG được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *porA pseudogene* của *Neisseria gonorrhoeae*. Nồng độ đầu dò NG trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18 sau:

Đầu dò NG	Số trình tự
TACGCCTGCTACTTTCACGCTGG	SEQ ID NO.16
ATACGCCTGCTACTTTCACGCTGG	SEQ ID NO.17
CTATACGCCTGCTACTTTCACGCTGG	SEQ ID NO.18

Các đầu dò NG được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow

phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi CT bao gồm mồi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mồi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24 sau:

Mồi xuôi CT	Số trình tự
TTCAGTTGGGCCAGATCATGCC	SEQ ID NO.19
TTCAGTTGGGCCAGATCATG	SEQ ID NO.20
TTCAGTTGGGCCAGATCATGC	SEQ ID NO.21
Mồi ngược CT	Số trình tự
CTCTTCATCGGTGGCTAATGC	SEQ ID NO.22
CTCTTCATCGGTGGCTAATGT	SEQ ID NO.23
CTCTTCATCGGTGGCTAATGTA	SEQ ID NO.24

Cặp mồi CT cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *trpB* của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* có kích thước khoảng 77 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò CT được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *trpB* của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*. Nồng độ đầu dò GV trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27 sau:

Đầu dò CT	Số trình tự
AAAAGGCTCGTCCTGACTCATGCAT	SEQ ID NO.25
AAAGGCTCGTCCTGACTCATGCAT	SEQ ID NO.26
AAAGGCTCGTCCTGACTCATGCATT	SEQ ID NO.27

Đầu dò CT được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi beta-actin được thiết kế dựa trên trình tự gen beta-actin cho phép nhân đoạn đặc hiệu kích thước 92 bp nêu trong SEQ ID NO.91. Cặp mồi beta-actin bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80 sau:

Cặp mồi beta-actin	Số trình tự
TGAGCGCGGCTACAGCTT	SEQ ID NO.79
TCCTTAATGTCACGCACGATTT	SEQ ID NO.80

Cặp mồi beta-actin cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen beta-actin chuẩn nội của người. Đoạn khuếch đại đặc hiệu của gen beta-actin này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.91 và có kích thước 92 bp. Nồng độ cặp mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 10 pmol/μl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, đối với mỗi cặp mồi, lượng mồi xuôi và mồi ngược luôn bằng nhau, do đó, nồng độ của mỗi đoạn mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81 sau:

Đầu dò beta-actin	Số trình tự
CCACCACGGCCGAGCGG	SEQ ID NO.81

Đầu dò beta-actin được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò này cho phép bắt cặp đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO.66 và giải phóng chất hấp thụ huỳnh quang hấp thụ ánh sáng có bước sóng 580 nm và phát xạ ở bước sóng 604 nm cho phép phát hiện được trên kênh màu chuẩn của thiết bị realtime-PCR. Nồng độ của mỗi đoạn mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Dung dịch MX2 là dung dịch dùng trong phản ứng PCR, trong đó dung dịch này bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza và còn chứa cặp mồi HSV-1, CA, TV và beta-actin, đầu dò HSV-1, CA, TV và beta-actin.

Cặp mồi HSV-1 bao gồm mồi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mồi ngược HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33 sau:

Mồi xuôi HSV-1	Số trình tự
AGCTTGCGGGCCTCGTTC	SEQ ID NO.28
AGCTTGCGGGCCTCGTT	SEQ ID NO.29
AGCTTGCGGGCCTCGTTCC	SEQ ID NO.30
Mồi ngược HSV-1	Số trình tự
GCAGTTTACGTACAACCACATACAGCG	SEQ ID NO.31
GCAGTTTACGTACAACCACATACAGC	SEQ ID NO.32
GCAGTTTACGTACAACCACATACAGCGC	SEQ ID NO.33

Cặp mồi HSV-1 cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *UL27* của *Herpes simplex virus 1* có kích thước khoảng 121 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò HSV-1 được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *UL27* của virus Herpes simplex 1. Nồng độ đầu dò HSV-1 trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36 sau:

Đầu dò HSV-1	Số trình tự
CGGCCCAACATATCGTTGACATGGCG	SEQ ID NO.34
CGGCCCAACATATCGTTGACATGGC	SEQ ID NO.35
CGGCCCAACATATCGTTGACATGGG	SEQ ID NO.36

Đầu dò HSV-1 được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi CA bao gồm mồi xuôi bao gồm mồi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mồi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42 sau:

Mồi xuôi CA	Số trình tự
GTAGAAGGTCTGCTTCGTATG	SEQ ID NO.37
GTAGAAGGTCTGCTTCGTATGG	SEQ ID NO.38
GTAGAAGGTCTGCTTCGTATGGG	SEQ ID NO.39
Mồi ngược CA	Số trình tự
GTGACTTCAAGTTCGCATATT	SEQ ID NO.40
GTGACTTCAAGTTCGCATATTG	SEQ ID NO.41
GTGACTTCAAGTTCGCATATTGC	SEQ ID NO.42

Cặp mồi CA cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của nấm *Candida albicans* có kích thước khoảng 104 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/ μ l.

Đầu dò CA được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của nấm *Candida albicans*. Nồng độ đầu dò CA trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/ μ l. Đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45 sau:

Đầu dò CA	Số trình tự
CCGTGGATGGTTGGCTGTGAGTA	SEQ ID NO.43
CCGTGGATGGTTGGCTGTGAGTAA	SEQ ID NO.44
GCCGTGGATGGTTGGCTGTGAGTAAT	SEQ ID NO.45

Đầu dò CA được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi TV bao gồm mồi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và mồi ngược TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51 sau:

Mồi xuôi TV	Số trình tự
AACATTGACCACACGGAC	SEQ ID NO.46
AACATTGACCACACGGACAA	SEQ ID NO.47
AACATTGACCACACGGACAAA	SEQ ID NO.48
Mồi ngược TV	Số trình tự
TTGGAACGTAAAGGCTTCTTC	SEQ ID NO.49
CTTGGAACGTAAAGGCTTCTTC	SEQ ID NO.50
CCTTGGAACGTAAAGGCTTCTTC	SEQ ID NO.51

Cặp mồi TV cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *Repeated DNA target* của vi khuẩn *Trichomonas vaginalis* có kích thước khoảng 94 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/ μ l.

Đầu dò TV được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *Repeated DNA target* của vi khuẩn *Trichomonas vaginalis*. Nồng độ đầu dò TV trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/ μ l. Đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54 sau:

Đầu dò TV	Số trình tự
TCATTTCGGATGGTCAAGCAGC	SEQ ID NO.52
TCATTTCGGATGGTCAAGCAGCCA	SEQ ID NO.53
TCATTTCGGATGGTCAAGCAGCCAA	SEQ ID NO.54

Đầu dò TV được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi beta-actin được thiết kế dựa trên trình tự gen beta-actin cho phép nhân đoạn đặc hiệu kích thước 92 bp nêu trong SEQ ID NO.91. Cặp mồi beta-actin bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80 sau:

Cặp môi beta-actin	Số trình tự
TGAGCGCGGCTACAGCTT	SEQ ID NO.79
TCCTTAATGTCACGCACGATTT	SEQ ID NO.80

Cặp môi beta-actin cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen beta-actin chuẩn nội của người. Đoạn khuếch đại đặc hiệu của gen beta-actin này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.91 và có kích thước 92 bp. Nồng độ cặp môi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 10 pmol/μl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, đối với mỗi cặp môi, lượng môi xuôi và môi ngược luôn bằng nhau, do đó, nồng độ của mỗi đoạn môi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81 sau:

Đầu dò beta-actin	Số trình tự
CCACCACGGCCGAGCGG	SEQ ID NO.81

Đầu dò beta-actin được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò này cho phép bắt cặp đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO.66 và giải phóng chất hấp thụ huỳnh quang hấp thụ ánh sáng có bước sóng 580 nm và phát xạ ở bước sóng 604 nm cho phép phát hiện được trên kênh màu chuẩn của thiết bị realtime-PCR. Nồng độ của mỗi đoạn môi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Dung dịch MX3 là dung dịch dùng trong phản ứng PCR, trong đó dung dịch này bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza và còn chứa cặp môi MH, HSV-2, MG và beta-actin, đầu dò MH, HSV-2, MG và beta-actin.

Cặp môi MH bao gồm môi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và môi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60 sau:

Môi xuôi MH	Số trình tự
TTTGGTCAAGTCCTGCAAC	SEQ ID NO.55
TTTGGTCAAGTCCTGCAACGA	SEQ ID NO.56
TTTGGTCAAGTCCTGCAACGAG	SEQ ID NO.57
Môi ngược MH	Số trình tự
CCCCACCTTCCTCCCAGT	SEQ ID NO.58

CCCCACCTTCCTCCCAGTTA	SEQ ID NO.59
TCCCCACCTTCCTCCCAGTTA	SEQ ID NO.60

Cặp mồi MH cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của vi khuẩn *Mycoplasma hominis* có kích thước khoảng 105 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò MH được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của vi khuẩn *Mycoplasma hominis*. Nồng độ đầu dò MH trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63 sau:

Đầu dò MH	Số trình tự
TACTAACATTAAGTTGAGGACTC	SEQ ID NO.61
TACTAACATTAAGTTGAGGACTCTA	SEQ ID NO.62
TACTAACATTAAGTTGAGGACTCTAGA	SEQ ID NO.63

Đầu dò MH được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi HSV-2 bao gồm mồi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66 và mồi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69 sau:

Mồi ngược HSV-2	Số trình tự
TGCAGTTTACGTATAACCACATACA	SEQ ID NO.64
TGCAGTTTACGTATAACCACATACAGC	SEQ ID NO.65
TGCAGTTTACGTATAACCACATACAGCG	SEQ ID NO.66

Cặp mồi HSV-2 cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen *UL27* của *Herpes simplex virus 2* có kích thước khoảng 121 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò HSV-2 được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *UL27* của *Herpes simplex virus 2*. Nồng độ đầu dò HSV-2 trong mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69 sau:

Đầu dò HSV-2	Số trình tự
CGCCCCAGCATGTCGTTTCAC	SEQ ID NO.67
CGCCCCAGCATGTCGTTTCACGT	SEQ ID NO.68
CGCCCCAGCATGTCGTTTCACGTG	SEQ ID NO.69

Đầu dò HSV-2 được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi MG bao gồm mồi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và mồi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75 sau:

Mồi xuôi MG	Số trình tự
ATTATGCGCACCAGTTACTTG	SEQ ID NO.70
TTATGCGCACCAGTTACTTG	SEQ ID NO.71
CATTATGCGCACCAGTTACTTG	SEQ ID NO.72
Mồi ngược MG	Số trình tự
AAGTTCAACTGCAGTAGTTG	SEQ ID NO.73
AAGTTCAACTGCAGTAGTTGT	SEQ ID NO.74
AAGTTCAACTGCAGTAGTTGTT	SEQ ID NO.75

Cặp mồi MG cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu gen mã hóa cho *Hypothetical protein* của vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* có kích thước khoảng 135 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò MG được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen *Hypothetical protein* của vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*. Nồng độ đầu dò MG trong

mỗi phản ứng PCR từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78 sau:

Đầu dò MG	Số trình tự
GGTGTGGATCGAGCG	SEQ ID NO.76
GGTGTGGATCGAGCGGC	SEQ ID NO.77
GGTGTGGATCGAGCGGCA	SEQ ID NO.78

Đầu dò MG được gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Cặp mồi beta-actin được thiết kế dựa trên trình tự gen beta-actin cho phép nhân đoạn đặc hiệu kích thước 92 bp nêu trong SEQ ID NO.91. Cặp mồi beta-actin bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80 sau:

Cặp mồi beta-actin	Số trình tự
TGAGCGCGGCTACAGCTT	SEQ ID NO.79
TCCTTAATGTCACGCACGATTT	SEQ ID NO.80

Cặp mồi beta-actin cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen beta-actin chuẩn nội của người. Đoạn khuếch đại đặc hiệu của gen beta-actin này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.91 và có kích thước 92 bp. Nồng độ cặp mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 10 pmol/μl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, đối với mỗi cặp mồi, lượng mồi xuôi và mồi ngược luôn bằng nhau, do đó, nồng độ của mỗi đoạn mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81 sau:

Đầu dò beta-actin	Số trình tự
CCACCACGGCCGAGCGG	SEQ ID NO.81

Đầu dò beta-actin được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò này cho phép bắt cặp đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ

ID NO.66 và giải phóng chất hấp thụ huỳnh quang hấp thụ ánh sáng có bước sóng 580 nm và phát xạ ở bước sóng 604 nm cho phép phát hiện được trên kênh màu chuẩn của thiết bị realtime-PCR. Nồng độ của mỗi đoạn mỗi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/ μ l.

Dung dịch PC là dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau và được sử dụng như đối chứng dương. Cụ thể là các plasmit tái tổ hợp này độc lập chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82 đặc hiệu cho gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.83 đặc hiệu cho gen *porA pseudogene* của *Neisseria gonorrhoeae*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.84 đặc hiệu cho gen *trpB* của *Chlamydia trachomatis*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.85 đặc hiệu cho gen *UL27* của virus Herpes simplex 1, trình tự nêu trong SEQ ID NO.86 đặc hiệu cho gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của *Candida albicans*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.87 đặc hiệu cho gen *Repeated DNA target* của *Trichomonas vaginalis*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.88 đặc hiệu cho gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của *Mycoplasma hominis*, trình tự nêu trong SEQ ID NO.89 đặc hiệu cho gen mã hóa cho *UL27* của virus Herpes simplex 2, trình tự nêu trong SEQ ID NO.90 đặc hiệu cho gen mã hóa cho *Hypothetical protein* của *Mycoplasma genitalium* và trình tự nêu trong SEQ ID NO.91 đặc hiệu cho gen mã hóa cho beta-actin. Các trình tự này được tốt nhất được tái tổ hợp trong plasmit, ví dụ pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2, và mỗi loại plasmit này có trong đối chứng dương với nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/ μ l.

Plasmit PC_GV là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82 có kích thước 102 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *tuf* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_GV này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82.

Plasmit PC_NG là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.83 có kích thước 95 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *porA pseudogene* của *Neisseria gonorrhoeae*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *porA pseudogene* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_NG này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.83.

Plasmit PC_CT là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.84 có kích thước 77 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *trpB* của *Chlamydia trachomatis*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *trpB* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_CT này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.84.

Plasmit PC_HSV1 là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.85 có kích thước 121 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *UL27* của virus Herpes simplex 1. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *UL27* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_HSV1 này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.85.

Plasmit PC_CA là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.86 có kích thước 104 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của *Candida albicans*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen RPR1 trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_CA này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.86.

Plasmit PC_TV là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.87 có kích thước 94 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *Repeated DNA target* của *Trichomonas vaginalis*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *Repeated DNA target* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_TV này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.87.

Plasmit PC_MH là một plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.88 có kích thước 105 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của *Mycoplasma hominis*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *rrnB* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC_MH này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.88.

Plasmid PC_HSV2 là một plasmid tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.89 có kích thước 121 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *UL27* của *Herpes simplex virus 1*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *UL27* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmid PC_HSV2 này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.89.

Plasmid PC_MG là một plasmid tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.90 có kích thước 135 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *Hypothetical protein* của *Mycoplasma genitalium*. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *Hypothetical protein* trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmid PC_MG này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.90.

Plasmid IC-actin là một plasmid tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.91 có kích thước 92 bp, đây là một đoạn đặc trưng của beta-actin của người. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen beta-actin trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmid IC-actin này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.91.

Plasmid	Trình tự tái tổ hợp	Số trình tự
PC_GV	AAGCCATTCTTGATGCCAATCGAAGATGTGTTTCACC ATCTCCGGTCGTGGTACCGTTGTCACCGGTCGTGTT GAGCGTGGTAAGCTCCCAATCAACACCCCA	SEQ ID NO.82
PC_NG	GGCAGCATTCAATTTGTTCCGAGTCAAAACAGCAAG TCCGCCTATACGCCTGCTACTTTCACGCTGGAAAGT AATCAGATGAAACCAGTTCCGGC	SEQ ID NO.83
PC_CT	CCTTCAGTTGGGCCAGATCATGCCGAAATGCATGAG TCAGGACGAGCCTTTTATACATTAGCCACCGATGAA GAGGC	SEQ ID NO.84
PC_HSV- 1	TCAGCTTGCGGGCCTCGTTCCACAGGGTCAGCTCGT GATTCTGTAGCTCGCACCCACGCGATGGCAACGCGGC CCAACATATCGTTGACATGGCGCTGTATGTGGTTGT ACGTAAACTGCAG	SEQ ID NO.85
PC_CA	CTGTAGAAGGTCTGCTTCGTATGGGAATGGCGCCGT GGATGGTTGGCTGTGAGTAATTCTTTACTACAAGCT GTTTAGTGCAATATGCGAACTTGAAGTCACCT	SEQ ID NO.86

PC_TV	CAAACATTGACCACACGGACAAAAAGTGTCATTTTCG GATGGTCAAGCAGCCAATCGCATTCGAGCACTTCGA AGAAGCCTTTACGTTCCAAGGG	SEQ ID NO.87
PC_MH	TGTTTGGTCAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTAT CTTTAGTTACTAACATTAAGTTGAGGACTCTAGAGA TACTGCCTGGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGGAT	SEQ ID NO.88
PC_HSV- 2	TGAGCTTGCGGGCCTCGTTCCATAGAGTCAGCTCGT GGTTCTGCAGCTCGCACACGCGACGGCGATGCGCC CCAGCATGTCGTTACGTGGCGCTGTATGTGGTTGT ACGTAAACTGCAG	SEQ ID NO.89
PC_MG	CATTATGCGCACCAAGTTACTTGAAAAAATACCCAT AATGAATAGTGATAGTGATCTAAACTCCAAAAGGT GTGGATCGAGCGGCATGTTGATCAAGATGAACTTAG TTTAACAACACTACTGCAGTTGAACTTAA	SEQ ID NO.90
IC_actin	TGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCG GGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAAAGGGCGAATT CTGCAGATATCCATCACACTG	SEQ ID NO.91

Các plasmid này được phối trộn với nhau theo tỷ lệ bằng nhau với mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmid/ μ l tạo thành dung dịch PC để làm đối chứng dương trong kit theo sáng chế.

Theo đó, kit theo sáng chế bao gồm các dung dịch MX1, MX2, MX3 và PC với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mồi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Mồi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mồi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Mồi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mồi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mồi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Mỗi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmid tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng 10^3 đến 10^5 plasmid/μl, trong đó: plasmid PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmid PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmid PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmid PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmid PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmid PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmid PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmid PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmid PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmid IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các đầu dò độc lập có trong các dung dịch MX1, MX2, MX3 có đầu 5' được gắn chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử

proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo các plasmit tái tổ hợp; b) tổng hợp các đoạn mồi; c) tổng hợp các đầu dò; và d) tạo kit.

Trong bước tạo các plasmit tái tổ hợp, các đoạn gen đặc hiệu cho các tác nhân gây bệnh bao gồm *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2, *Mycoplasma genitalium* và beta-actin của người được phân lập hoặc được tổng hợp, các đoạn gen này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91.

Các plasmit được sử dụng làm plasmit tái tổ hợp có thể được chọn từ nhóm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2. Các plasmit này là plasmit thương mại và kỹ thuật tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp plasmit. Theo một phương án ưu tiên, plasmit được sử dụng làm plasmit tái tổ hợp tốt hơn là plasmit pUC19, tốt hơn nữa là pJET1 hoặc pTOP TA V2.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* được sử dụng để tạo ra plasmit tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.82, đây là đoạn gen đặc trưng gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *tuf* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 102 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.83, đây là đoạn gen đặc trưng gen *porA pseudogene* của vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *porA pseudogene* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 95 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.84, đây là đoạn gen đặc trưng gen *trpB* của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *trpB* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 77 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho virus Herpes simplex 1 được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.85, đây là đoạn gen đặc trưng gen *UL27* của virus Herpes simplex 1. Đoạn gen này có thể được phân lập từ virus Herpes simplex 1 hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *UL27* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 121 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi nấm *Candida albicans* được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.86, đây là đoạn gen đặc trưng gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của vi nấm *Candida albicans*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi nấm *Candida albicans* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 104 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho trùng roi *Trichomonas vaginalis* được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.87, đây là đoạn gen đặc trưng gen *Repeated DNA target* của trùng roi *Trichomonas vaginalis*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ trùng roi *Trichomonas vaginalis* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *Repeated DNA target* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 94 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Mycoplasma hominis* được sử dụng trong plasmid tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.88, đây là đoạn gen đặc trưng gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của vi khuẩn *Mycoplasma hominis*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi khuẩn *Mycoplasma hominis* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với

đoạn gen *ribosomal RNA operon*, *rrnB* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 105 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho virus Herpes simplex 2 được sử dụng trong plasmit tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.89, đây là đoạn gen đặc trưng gen *UL27* của virus Herpes simplex 2. Đoạn gen này có thể được phân lập từ virus Herpes simplex 2 hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *UL27* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 121 bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* được sử dụng trong plasmit tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.90, đây là đoạn gen đặc trưng gen *Hypothetical protein* của vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*. Đoạn gen này có thể được phân lập từ vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen *Hypothetical protein* trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 135bp.

Đoạn gen đặc hiệu cho beta-actin của người được sử dụng trong plasmit tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.92, đây là đoạn gen đặc trưng gen beta-actin của người. Đoạn gen này có thể được phân lập hoặc được tổng hợp, đóng vai trò đối chứng với đoạn gen beta-actin trong mẫu sinh học cần phát hiện và có kích thước 92bp.

Các đoạn gen trên lần lượt được cắt và nối vào plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 theo như hướng dẫn của nhà cung cấp plasmit. Sau đó và biến nạp vào tế bào *E.coli*, sau khi nuôi cấy, chiết tách thu được 10 loại plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 tương ứng. Các plasmit tái tổ hợp này được ký hiệu là PC_NG (chứa SEQ ID NO.82), PC_NG (chứa SEQ ID NO.83), PC_CT (chứa SEQ ID NO.84), PC_HSV1 (chứa SEQ ID NO.85), PC_CA (chứa SEQ ID NO.86), PC_TV (chứa SEQ ID NO.87), PC_MH (chứa SEQ ID NO.88), PC_HSV-2 (chứa SEQ ID NO.89), PC_MG (chứa SEQ ID NO.90), IC-actin (chứa SEQ ID NO.91), các plasmit này được định lượng đến 10^6 plasmit/ μ l bằng nước cất khử proteaza.

Trong bước tổng hợp các đoạn mồi, các đoạn mồi được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm cặp mồi GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin. Mỗi cặp mồi này bao gồm mồi xuôi và mồi ngược nhằm khuếch đại các đoạn gen GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin, tương ứng. Các tác giả đã nghiên cứu và tối ưu các đoạn mồi này cho phép sử dụng kỹ thuật PCR đa mồi mà vẫn

nhân đặc hiệu được đoạn gen mong muốn. Các đoạn mỗi độc lập được tổng hợp và định lượng đến nồng độ 100 pmol/μl bằng nước khử proteaza. Các kỹ thuật tổng hợp đoạn mỗi là đã biết và có thể thực hiện được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cặp mỗi GV được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mỗi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6. Cặp mỗi này cho phép nhân đoạn gen *tuf* của vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* có kích thước 102 bp như nêu trong SEQ ID NO.82.

Cặp mỗi NG được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mỗi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15. Cặp mỗi này cho phép nhân đoạn gen *porA pseudogene* của vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* có kích thước 95 bp như nêu trong SEQ ID NO.83.

Cặp mỗi CT được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mỗi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24. Cặp mỗi này cho phép nhân đoạn gen *trpB* của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* có kích thước 77 bp như nêu trong SEQ ID NO.84.

Cặp mỗi HSV-1 được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mỗi ngược HSV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33. Cặp mỗi này cho phép nhân đoạn gen *UL27* của virus Herpes simplex 1 có kích thước 121 bp như nêu trong SEQ ID NO.85.

Cặp mỗi CA được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mỗi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42. Cặp mỗi này cho phép nhân đoạn gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của vi nấm *Candida albicans* có kích thước 104 bp như nêu trong SEQ ID NO.86.

Cặp mỗi TV được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mỗi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và mỗi ngược TV có

trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51. Cặp mồi này cho phép nhân đoạn gen *repeated ADN target* của trùng roi *Trichomonas vaginalis* có kích thước 94 bp như nêu trong SEQ ID NO.87.

Cặp mồi MH được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mồi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và mồi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60. Cặp mồi này cho phép nhân đoạn gen *ribosomal ARN operon* của vi khuẩn *Mycoplasma hominis* có kích thước 105bp như nêu trong SEQ ID NO.88.

Cặp mồi HSV-2 được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mồi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mồi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66. Cặp mồi này cho phép nhân đoạn gen *UL27* của virus Herpes simplex 2 có kích thước 121bp như nêu trong SEQ ID NO.89.

Cặp mồi MG được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mồi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và mồi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75. Cặp mồi này cho phép nhân đoạn gen mã hóa cho *Hypothetical protein* của vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* có kích thước 135 bp như nêu trong SEQ ID NO.90.

Cặp mồi beta-actin được sử dụng trong kit theo sáng chế bao gồm mồi xuôi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mồi ngược beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80. Cặp mồi này cho phép nhân đoạn gen beta-actin có kích thước 92bp như nêu trong SEQ ID NO.91.

Trong bước tổng hợp các đầu dò, các đầu dò độc lập được tổng hợp bao gồm các đầu dò GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin. Các đầu dò này được tổng hợp nhân tạo và gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5). Tại vị trí nucleotit thứ 9 của đầu dò được gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò. Các tín hiệu huỳnh quang xuất hiện của quá trình

realtime PCR được ghi lại và từ đó có thể phát hiện và định lượng được sự có mặt cũng như nồng độ của các gen đích. Căn cứ trên tín hiệu màu sắc huỳnh quang thu được, có thể định tính hoặc định lượng được gen đích tương ứng. Các kỹ thuật gắn huỳnh quang cho đầu dò là đã biết và có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đầu dò sau đó được chuẩn độ đến 10 pmol/ μ l trước khi phối trộn tạo các dung dịch trong kit theo sáng chế.

Đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò GV này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò GV này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *tuf* của vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* có kích thước 102 bp nêu trong SEQ ID NO.82 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi GV theo sáng chế.

Đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò NG này được gắn huỳnh quang được chọn từ nhóm 6-carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6-carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò NG này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *porA pseudogene* của vi khuẩn *Gardnerella vaginalis* có kích thước 95 bp như nêu trong SEQ ID NO.83 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi NG theo sáng chế.

Đầu dò CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò CT này được gắn huỳnh quang Cy5 (Cyanine-5) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò CT này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen

trpB của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* có kích thước 77 bp như nêu trong SEQ ID NO.84 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi CT theo sáng chế.

Đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò HSV-1 này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò HSV-1 này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *UL27* của virus Herpes simplex 1 có kích thước 121 bp như nêu trong SEQ ID NO.85 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi HSV-1 theo sáng chế.

Đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò CA này được gắn huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò CA này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *ribonuclease P RNA* (RPR1) của vi nấm *Candida albicans* có kích thước 104 bp như nêu trong SEQ ID NO.86 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi CA theo sáng chế.

Đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò TV này được gắn huỳnh quang Cy5 (Cyanine-5) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò TV này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *repeated ADN target* của trùng roi *Trichomonas vaginalis* có kích thước 94 bp như nêu trong SEQ ID NO.87 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi TV theo sáng chế.

Đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang

ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò MH này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò MH này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *ribosomal ARN operon* của vi khuẩn *Mycoplasma hominis* có kích thước 105bp như nêu trong SEQ ID NO.88 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi MH theo sáng chế.

Đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, đầu dò này được gắn huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò HSV-2 này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen *UL27* của virus Herpes simplex 2 có kích thước 121bp như nêu trong SEQ ID NO.89 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi HSV-2 theo sáng chế.

Đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò MG này được gắn huỳnh quang Cy5 (Cyanine-5) ở đầu 5', gắn chất dập tắt huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò MG này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn mã hóa cho *Hypothetical protein* của vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* có kích thước 135 bp như nêu trong SEQ ID NO.90 được nhân đặc hiệu bởi cặp mồi MG theo sáng chế.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81, đầu dò này được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5', chất dập tắt huỳnh quang ở nucleotit thứ 9 và chất hấp thụ huỳnh quang ở đầu 3' nêu trên. Theo các phương án ưu tiên cụ thể, đầu dò beta-actin này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, đầu dò beta-actin được gắn huỳnh quang Texas Red cho kênh màu đỏ trong kênh màu chuẩn của thiết bị realtime-PCR.

Đầu dò beta-actin này cho phép gắn đặc hiệu với đoạn gen beta-actin có kích thước 92bp như nêu trong SEQ ID NO.91 được nhân đặc hiệu bởi cặp môi beta-actin theo sáng chế.

Để tạo kit, các thành phần đã được định lượng nêu trên được phối trộn với nhau trong dung dịch đệm hoặc nước khử proteaza để tạo thành các dung dịch được ký hiệu MX1, MX2, MX3 và PC dùng trong phản ứng realtime-PCR với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Môi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Môi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và
		Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và
		Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Môi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Môi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Mỗi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Mỗi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mỗi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Mỗi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmid tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng 10^3 đến 10^5 plasmid/ μ l, trong đó: plasmid PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmid PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmid PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmid PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmid PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmid PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmid PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmid PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmid PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmid IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91;

Các dung dịch sau khi được phối trộn, được đóng trong các lọ độc lập. Các lọ này được đóng gói thu được kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 loại tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

Sáng chế còn đến bộ mỗi dùng trong kit theo sáng chế, trong đó bộ mỗi này bao gồm các cặp mỗi GV, NG, CT, GV, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin, trong đó:

- cặp mỗi GV bao gồm mỗi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mỗi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6;

- cặp mỗi NG bao gồm mỗi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mỗi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15;

- cặp mỗi CT bao gồm mỗi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mỗi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24;

- cặp mỗi HSV-1 bao gồm mỗi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mỗi ngược HSV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33;

- cặp mỗi CA bao gồm mỗi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mỗi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42;

- cặp mỗi TV bao gồm mỗi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và mỗi ngược TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51;

- cặp mỗi MH bao gồm mỗi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và mỗi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60;

- cặp mỗi HSV-2 bao gồm mỗi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mỗi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66;

- cặp mỗi MG bao gồm mỗi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và mỗi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75; và

- cặp mỗi beta-actin bao gồm mỗi xuôi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và mỗi ngược beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ đầu dò dùng trong kit theo sáng chế bao gồm đầu dò GV, NG, CT, GV, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin, trong đó đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9; đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18; đầu dò CT

có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27; đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36; đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45; đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54; đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63; đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69; đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78; và đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81.

Các đầu dò của bộ đầu dò theo sáng chế còn có đầu 5' được gắn chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'-phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục

Sản xuất các dung dịch PCR

Để sản xuất kit bao gồm 24 mẫu phản ứng để phát hiện đồng thời 9 loài tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), các đoạn mỗi xuôi, mỗi ngược và đầu dò huỳnh quang độc lập được tổng hợp hóa học bởi hãng IDT và được định lượng đến nồng độ xác định. Các thành phần khác bao gồm các dung dịch dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP, UNG (uracil-N-glycosylase), Taq ADN polymeraza là các thành phần thương mại của hãng Enzymonics, Hàn Quốc.

Các thành phần sau khi tổng hợp được thể hiện trong bảng sau:

Thành phần pha chế dung dịch PCR số 1 (MX1)		
Thành phần	Trình tự	Hàm lượng pmol/μl
Mồi xuôi GV	CATTCTTGATGCCAATCG	100
Mồi ngược GV	GGGTGTTGATTGGGAGCTT	100
Đầu dò GV	TGTTCAACCATCTCCGGTCGTGGT	10
Mồi xuôi NG	CAGCATTCAATTTGTTCCGAG	100
Mồi ngược NG	GAAGTGGTTTCATCTGATTAC	100
Đầu dò NG	ACGCCTGCTACTTTCACGCTGG	10
Mồi xuôi CT	CAGTTGGGCCAGATCATG	100
Mồi ngược CT	CTTCATCGGTGGCTAATGT	100
Đầu dò CT	AGGCTCGTCCTGACTCATGCAT	10
Mồi xuôi beta-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTT	100
Mồi ngược beta-actin	TCCTTAATGTCACGCACGATTT	100
Đầu dò beta-actin	CCACCACGGCCGAGCGG	10
IC-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCC GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAAA GGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG	10 ⁶ bản sao/ μl
Thành phần pha chế dung dịch PCR số 2 (MX2)		
Thành phần	Trình tự	Hàm lượng pmol/μl
Mồi xuôi HSV-1	CTTGCGGGCCTCGTT	100
Mồi ngược HSV-1	CAGTTTACGTATAACCACATACAGC	100
Đầu dò HSV-1	GCCCAACATATCGTTGACATGGC	10
Mồi xuôi CA	AGAAGGTCTGCTTCGTATGG	100
Mồi ngược CA	GACTTCAAGTTCGCATATTG	100
Đầu dò CA	GTGGATGGTTGGCTGTGAGTAA	10
Mồi xuôi TV	CATTGACCACACGGACAA	100
Mồi ngược TV	TGGAACGTAAAGGCTTCTTC	100
Đầu dò TV	ATTTCCGATGGTCAAGCAGCCA	10
Mồi xuôi beta-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTT	100
Mồi ngược beta-actin	TCCTTAATGTCACGCACGATTT	100

Đầu dò beta-actin	CCACCACGGCCGAGCGG	10
IC-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCC GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAAA GGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG	10 ⁶ bản sao/ µl
Thành phần pha chế dung dịch PCR số 3 (MX3)		
Thành phần	Trình tự	Hàm lượng pmol/µl
Mồi xuôi MH	TGGTCAAGTCCTGCAACGA	100
Mồi ngược MH	CCACCTTCCTCCCAGTTA	100
Đầu dò MH	CTAACATTAAGTTGAGGACTCTA	10
Mồi xuôi HSV-2	CTTGCGGGCCTCGTT	100
Mồi ngược HSV-2	AGTTTACGTACAACCACATACAGC	100
Đầu dò HSV-2	CCCCAGCATGTCGTTACGTT	10
Mồi xuôi MG	ATGCGCACCAAGTTACTTG	100
Mồi ngược MG	GTTCAACTGCAGTAGTTGT	100
Đầu dò MG	TGTGGATCGAGCGGC	10
Mồi xuôi beta-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTT	100
Mồi ngược beta-actin	TCCTTAATGTCACGCACGATT	100
Đầu dò beta-actin	CCACCACGGCCGAGCGG	10
IC-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCC GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAAA GGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG	10 ⁶ bản sao/ µl

+ Pha chế dung dịch MX1:

Lấy 325 µl dung dịch đệm 2X chứa các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chuẩn theo dung dịch thương mại của hãng Enzymomics, Hàn Quốc và bổ sung lần lượt 13 µl nTaq Hot (5Unit/µl), 2,6 µl mồi xuôi GV, 2,6 µl mồi ngược GV, 2,6 µl đầu dò GV, 2,6 µl mồi xuôi NG, 2,6 µl mồi ngược NG, 2,6 µl đầu dò NG, 2,6 µl mồi xuôi CT, 2,6 µl mồi ngược CT, 2,6 µl đầu dò CT, 0,8 µl mồi xuôi beta-actin, 0,8 µl mồi ngược beta-actin, 2,6 µl đầu dò beta-actin, 2,6 µl IC_actin. Cuối cùng bổ sung 160 µl nước khử nucleaza để thu được 520 µl dung dịch phản ứng PCR, ký hiệu MX1. Dung dịch này được chia đều vào 24 ống nhựa PCR dung tích 200 µl, mỗi ống 20 µl thu được 24 ống phản ứng.

+ Pha chế dung dịch MX2:

Lấy 325 μ l dung dịch đậm 2X chứa các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chuẩn theo dung dịch thương mại của hãng Enzymomics, Hàn Quốc và bổ sung lần lượt 13 μ l nTaq Hot (5Unit/ μ l), 2,6 μ l mỗi xuôi HSV-1, 2,6 μ l mỗi ngược HSV-1, 2,6 μ l đầu dò HSV-1, 2,6 μ l mỗi xuôi CA, 2,6 μ l mỗi ngược CA, 2,6 μ l đầu dò CA, 2,6 μ l mỗi xuôi TV, 2,6 μ l mỗi ngược TV, 2,6 μ l đầu dò TV, 0,8 μ l mỗi xuôi beta-actin, 0,8 μ l mỗi ngược beta-actin, 2,6 μ l đầu dò beta-actin, 2,6 μ l IC_actin. Cuối cùng bổ sung 160 μ l nước khử nucleaza để thu được 520 μ l dung dịch phản ứng PCR, ký hiệu MX2. Dung dịch này được chia đều vào 24 ống nhựa PCR dung tích 200 μ l, mỗi ống 20 μ l thu được 24 ống phản ứng.

+ Pha chế dung dịch MX3:

Lấy 325 μ l dung dịch đậm 2X chứa các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chuẩn theo dung dịch thương mại của hãng Enzymomics, Hàn Quốc và bổ sung lần lượt 13 μ l nTaq Hot (5Unit/ μ l), 2,6 μ l mỗi xuôi MH, 2,6 μ l mỗi ngược MH, 2,6 μ l đầu dò MH, 2,6 μ l mỗi xuôi HSV-2, 2,6 μ l mỗi ngược HSV-2, 2,6 μ l đầu dò HSV-2, 2,6 μ l mỗi xuôi MG, 2,6 μ l mỗi ngược MG, 2,6 μ l đầu dò MG, 0,8 μ l mỗi xuôi beta-actin, 0,8 μ l mỗi ngược beta-actin, 2,6 μ l đầu dò beta-actin, 2,6 μ l IC_actin. Cuối cùng bổ sung 160 μ l nước khử nucleaza để thu được 520 μ l dung dịch phản ứng PCR, ký hiệu MX3. Dung dịch này được chia đều vào 24 ống nhựa PCR dung tích 200 μ l, mỗi ống 20 μ l thu được 24 ống phản ứng chứa dung dịch phản ứng PCR số 3.

Sản xuất mẫu đối chứng dương (PC)

Muối plasmit chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 lần lượt được được tạo ra bằng cách lần lượt gắn các trình tự SEQ ID NO.82-91 vào plasmit pTOP TA V2 để tạo ra các plasmit tái tổ hợp. Các plasmit này được biến nạp vào tế bào *E.coli* khả biến. Sau khi, chọn lọc, nuôi cấy và chiết tách thu plasmit tái tổ hợp. Các plasmit tái tổ hợp này được ký hiệu là PC_GV, PC_NG, PC_CT, PC_HSV1, PC_CA, PC_TV, PC_MH, PC_HSV2, PC_MG và IC-actin, tương ứng. Quá trình biến nạp, nhân dòng thu plasmit tái tổ hợp được đặt hàng và được công ty hóa sinh thứ ba thực hiện. Các plasmit tái tổ hợp này được chuẩn với hàm lượng 100 ng/ μ l.

Plasmit PC_GV thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82 có kích thước 102 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *tuf* của *Gardnerella vaginalis*.

Plasmit PC_NG thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.83 có kích thước 95 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *porA pseudogene* của *Neisseria gonorrhoeae*.

Plasmit PC_CT thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.84 có kích thước 77 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *trpB* của *Chlamydia trachomatis*.

Plasmit PC_HSV1 thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.85 có kích thước 121 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *UL27* của virus Herpes simplex 1.

Plasmit PC_CA thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.86 có kích thước 104 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *ribonuclease P RNA (RPR1)* của *Candida albicans*.

Plasmit PC_TV thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.87 có kích thước 94 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *Repeated DNA target* của *Trichomonas vaginalis*.

Plasmit PC_MH thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.88 có kích thước 105 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *ribosomal RNA operon, rrnB* của *Mycoplasma hominis*.

Plasmit PC_HSV2 thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.89 có kích thước 121 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *UL27* của *Herpes simplex virus 1*.

Plasmit PC_MG thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.90 có kích thước 135 bp, đây là một đoạn đặc trưng gen *Hypothetical protein* của *Mycoplasma genitalium*.

Plasmit IC-actin thu được là plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.91 có kích thước 92 bp, đây là một đoạn đặc trưng của beta-actin của người.

Để xác định số bản sao của plasmit, dựa theo công thức sau:

$$\frac{C \times 6,023 \times 10^{23}}{L \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó C (ng/μl) là nồng độ của plasmit, L (bp) là kích thước của vector pTOP TA V2 tái tổ hợp mang đoạn gen nêu trong SEQ ID NO.82-91, tương ứng.

Tiến hành pha loãng các plasmit tái tổ hợp thu được với nước cất khử proteaza đến nồng độ 10^5 bản sao/μl. Sau đó phối trộn 10 plasmit này với nhau theo tỷ lệ số bản sao bằng nhau với mỗi loại plasmit có nồng độ 10^4 plasmit/μl. Chia 20 μl dung dịch vào 3 ống nhựa PCR dung tích 200 μl thu được 3 mẫu đối chứng dương có nồng độ 10^4 plasmit/μl.

Sản xuất mẫu đối chứng âm (NC)

Nước khử proteaza được chia vào 3 ống nhựa PCR dung tích 200 μl thu được 3 mẫu đối chứng âm.

Tạo kit

Xếp lần lượt 72 mẫu dung dịch phản ứng PCR (20μl/ 1 mẫu) bao gồm 24 mẫu dung dịch PCR số 1, 24 mẫu dung dịch PCR số 2 và 24 mẫu dung dịch PCR số 3 bao thu được ở trên được đựng trong ống phản ứng PCR có dung tích 200 μl vào 6 dãy trên giá nhựa PCR 96 giếng. Các ống được đánh dấu MX1 (MasterMix 1) để phát hiện GV/NG/CT, MX2 (MasterMix 2) để phát hiện HSV1/CA/TV và MX3 (MasterMix 3) để phát hiện MH/HSV2/MG.

Xếp 3 mẫu đối chứng dương, mỗi mẫu 20 μl chứa trong ống nhựa PCR có dung tích 200 μl lên giá 96 giếng. Dán nhãn đánh dấu PC.

Xếp 3 mẫu đối chứng âm, mỗi mẫu 20 μl chứa trong ống nhựa PCR có dung tích 200 μl lên giá 96 giếng. Dán nhãn đánh dấu NC.

Đóng gói giá PCR 96 giếng đựng các ống mẫu dung dịch phản ứng PCR, mẫu đối chứng âm, mẫu đối chứng âm vào túi bạc và đóng kèm hướng dẫn sử dụng với túi zip bao ngoài, thu được kit để phát hiện đồng thời 9 tác nhân STD gây bệnh lây qua đường tình dục phổ biến ở người. Kit được bảo quản ở tủ -20°C . Thời gian sử dụng kit trong vòng 12 tháng.

Ví dụ 3. Thử nghiệm phát hiện vi sinh vật gây bệnh lây truyền qua đường tình dục của kit theo sáng chế

Để đánh giá hiệu quả phát hiện 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục phổ biến bao gồm vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*, virus Herpes simplex 1 và virus Herpes simplex 2 có trong mẫu sinh học, các thử nghiệm được tiến hành với các mẫu ADN tách chiết từ mẫu dịch phết niệu đạo/cổ tử cung của các bệnh nhân đến khám chữa bệnh tại bệnh viện Bạch Mai và bệnh viện Phụ Sản Hà Nội.

Các mẫu thử nghiệm được xét nghiệm bằng các phương pháp phát hiện thường quy tại bệnh viện (phương pháp soi tươi và nuôi cấy), trong đó bao gồm 84 mẫu dương tính và 153 mẫu âm tính với 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục nêu trên. Mẫu nhiễm các tác nhân gây bệnh khác bao gồm các mẫu ADN dương tính/âm tính với các tác nhân gây bệnh/lợi khuẩn thường thấy ở đường sinh dục của phụ nữ bao gồm: 01 mẫu *Escherichia coli* VTCC 12272, 01 mẫu *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12284, 01 mẫu *Lactobacillus plantarum* VTCC 10936, 01 mẫu *Bacillus subtilis* VTCC 11010, 01 mẫu *Bacillus coagulans* VTCC 11111 là các chủng chuẩn vi khuẩn cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, đại học Quốc gia Hà Nội.

Tách chiết ADN mẫu bệnh phẩm từ mẫu dịch phết niệu đạo/cổ tử cung sử dụng cột màng silica theo hướng dẫn của bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Đức). Mẫu ADN được tiến hành với kỹ thuật realtime-PCR với kit được sản xuất theo Ví dụ 1. Phản ứng PCR được thực hiện trên hệ thống máy realtime-PCR LightCycler 96, Roche Diagnostics.

Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện với 2 bước: 1 chu kỳ với 95°C trong 10 phút để biến tính, và 45 chu kỳ với các bước biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mỗi kéo dài chuỗi ở 60°C trong 30 giây.

Sau khi hoàn tất các chu kỳ nhiệt, kết quả realtime-PCR xác định khả năng phát hiện 09 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục của kit theo sáng chế được mô tả tại Bảng 1 và 2, và so sánh với kết quả xét nghiệm bằng các phương pháp phát hiện thường quy tại bệnh viện. Kết quả realtime-PCR thử nghiệm được thể hiện trên các hình từ Hình 1 đến Hình 8.

Bảng 1. Kết quả phát hiện 09 tác nhân gây bệnh trong các mẫu thử nghiệm

STT	Tác nhân gây bệnh	Số mẫu	Kết quả (+/-) của kit	Kết quả (+/-) thường quy	Độ tương đồng (%)
1	<i>G. vaginalis</i>	30	21/9	21/9	100
2	<i>N. gornorrhoeae</i>	24	10/14	10/14	100
3	<i>C. trachomatis</i>	23	6/17	6/17	100
4	HSV-1	22	10/12	16/12	100
5	<i>C. albicans</i>	25	15/10	15/10	100
6	<i>T. vaginalis</i>	21	7/14	7/14	100
7	<i>M. hominis</i>	24	2/22	2/22	100
8	HSV-2	22	12/10	12/10	100
9	<i>M. genitalium</i>	20	1/19	1/19	100
10	Mẫu âm tính	25	0/25	0/25	100

Bảng 2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của kit theo sáng chế và độ tương đồng với kết quả xét nghiệm thường quy tại bệnh viện

Xét nghiệm thường quy tại BV	Realtime-PCR thử nghiệm		Tổng cộng
	+	-	
+	84	0	84
-	0	152	152
Tổng cộng	84	152	236

Độ nhạy: 100%, Độ đặc hiệu: 100%

Kết quả trong Bảng 1 và 2 cho thấy thử nghiệm kit từ Ví dụ 1 trên 236 mẫu tham chiếu gồm 84 mẫu dương tính và 152 mẫu âm tính và so sánh với kết quả xét nghiệm thường quy tại bệnh viện cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật real time PCR phát hiện 09 tác nhân gây viêm phụ khoa đều là 100%. Kết quả realtime-PCR trên được đem kiểm tra đối chứng với các phương pháp phát hiện thường quy tại bệnh viện Bạch Mai và bệnh viện Phụ Sản Hà Nội cho kết quả tương đồng 100 % ở các trường hợp dương tính với tác nhân GV/HSV-1/CA/TV và đồng thời 2 tác nhân GV và CA. Tuy nhiên, ở trường hợp chẩn đoán GV sử dụng kit từ Ví dụ 1 dựa trên realtime-PCR cho

thấy kết quả vượt trội so với phương pháp thường quy (soi tươi) trong việc phát hiện mẫu bệnh ở nồng độ rất thấp. Từ đây rút ngắn được thời gian xét nghiệm, tránh bỏ sót trường hợp bệnh nhân mang tải lượng vi sinh vật thấp và giảm thiểu hiện tượng âm tính giả trong xét nghiệm và điều trị lâm sàng.

Hình 1 là kết quả realtime-PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương và đối chứng âm, không thu được tín hiệu của cả kênh FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu kênh HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu kênh Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) cho mẫu âm tính với cả ba tác nhân HSV-1, CA và TV.

Hình 2 là kết quả real time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với HSV-1 (tín hiệu FAM).

Hình 3 là kết quả real time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với CA (tín hiệu FAM).

Hình 4 là kết quả real time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với TV (tín hiệu Cy5).

Hình 5 là kết quả real time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho tác nhân HSV-1), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân CA), tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho tác nhân TV) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) của đối chứng dương, đối chứng âm và 01 mẫu dương tính với CA (tín hiệu

HEX); 01 mẫu dương tính đồng thời với cả hai tác nhân HSV-1 (tín hiệu FAM) và CA (tín hiệu HEX).

Kết quả Hình 6 cho thấy chỉ thu được tín hiệu kênh FAM đặc hiệu cho tác nhân GV và kênh Texas Red phát hiện gen nội chuẩn beta-actin và không thu được tín hiệu của kênh HEX và Cy5 cho 23 mẫu ADN bệnh nhân chỉ định xét nghiệm GV.

Bên cạnh đó, kết quả Hình 7 đại diện cho các mẫu bệnh nhân dương tính với CA (tín hiệu HEX) và không thu được các tín hiệu FAM (đặc trưng cho các tác nhân GV/HSV-1/MH) và tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho các tác nhân CT/TV/MG) trong 15 bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm CA.

Kết quả cũng cho thấy tín hiệu nền ở ngưỡng rất thấp, điều này cho thấy hiệu quả trong việc sử dụng tín hiệu dập tắt huỳnh quang trong các đoạn dò, từ đó tăng hiệu quả phát hiện cũng như tăng ngưỡng phát hiện cho phép định lượng tác nhân gây bệnh hiệu quả.

Ngoài ra, để kiểm tra độ đặc hiệu về khả năng dương tính giả gây ra bởi các vi sinh vật thường thấy ở đường sinh dục của phụ nữ, tiến hành thử nghiệm với các mẫu bao gồm: mẫu *Escherichia coli* VTCC 12272, mẫu *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12284, mẫu *Lactobacillus plantarum* VTCC 10936, mẫu *Bacillus subtilis* VTCC 11010, mẫu *Bacillus coagulans* VTCC 11111. Đây là các mẫu chuẩn thuộc chủng giống gốc được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội và một số mẫu ADN được xác định dương tính với virus HPV được cung cấp bởi bệnh viện Phụ Sản Trung ương. Kết quả được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của kit theo sáng chế trên các mẫu vi sinh vật tham chiếu khác

stt	Vi sinh vật tham chiếu	Kết quả realtime-PCR sử dụng kit theo Ví dụ 1								
		MX1			MX2			MX3		
		FAM	HEX	Cy5	FAM	HEX	Cy5	FAM	HEX	Cy5
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> VTCC 12284	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> VTCC 10936	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	VTCC 12272									
4	<i>Bacillus subtilis</i> VTCC 11010	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Bacillus coagulans</i> VTCC 11111	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	HPV	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Phân tích kết quả trên cả 15 loại tác nhân bao gồm 09 tác nhân gây bệnh phụ khoa, 06 loại lợi khuẩn/hại khuẩn khác thường thấy ở đường sinh dục của phụ nữ và các mẫu của người khỏe mạnh đều cho kết quả âm tính, không có hiện tượng dương tính giả. Điều đó chứng tỏ không có sự nhiễm chéo/phát hiện nhầm giữa các tác nhân trong nội bộ mastermix và với các tác nhân khác chứng tỏ bộ môi và probe của kit theo sáng chế được thiết kế đặc hiệu 100% với từng tác nhân gây bệnh.

Kết quả ở Hình 8 cho thấy chỉ thu được tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho gen nội chuẩn beta-actin) và không thu được bất cứ tín hiệu nào ở cả 3 kênh huỳnh quang FAM (đặc trưng cho các tác nhân GV/HSV-1/MH), tín hiệu HEX (đặc trưng cho tác nhân NG/CA/HSV-2) và tín hiệu Cy5 (đặc trưng cho các tác nhân CT/TV/MG) điều đó chứng tỏ kit đặc hiệu 100% với xét nghiệm phát hiện đồng thời các tác nhân gây bệnh.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục theo sáng chế cho phép xác định được 9 tác nhân gây bệnh nguy hiểm bao gồm cả vi khuẩn, vi nấm, virus và ký sinh trùng bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, vi nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*. Kit cho theo sáng chế cho phép phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh, tránh được các hiện tượng dương tính giả và/hoặc âm tính giả bởi các vi sinh vật lợi khuẩn hoặc không gây bệnh cùng khu trú khác.

Kit theo sáng chế được tối ưu hóa các đoạn môi, đoạn dò, cho phép rút ngắn thời gian xét nghiệm, quy trình được tối ưu, thao tác đơn giản với một chu trình nhiệt realtime-PCR mà vẫn đảm bảo ngưỡng phát hiện có độ nhạy cao (50-500 bản sao/pứ), độ nhạy và độ đặc hiệu đạt 100 % (tương đương với phương pháp soi và nuôi cấy thường

quy tốn kém và mất thời gian), tránh được các phản ứng chéo giữa các đoạn môi, đầu dò, cho phép thực hiện PCR đa môi với tín hiệu rõ ràng, dễ xác định.

Quy trình sản xuất kit theo sáng chế đơn giản, dễ áp dụng, cho phép phát triển kit phát hiện đồng thời 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục ở các quy mô khác nhau, kit dễ sử dụng cho phép phát hiện nhanh, chính xác và sàng lọc đồng thời nhiều tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục tại các phòng xét nghiệm, góp phần quan trọng trong việc hỗ trợ bác sĩ chẩn đoán sớm các tác nhân gây bệnh và đưa ra phác đồ điều trị hợp lý cho bệnh nhân.

- Ngoài việc sử dụng các đoạn môi đặc hiệu, các đoạn dò được gắn chất dập tắt huỳnh quang ở vị trí nucleotit thứ 9 cho thấy hiệu quả trong việc giảm tín hiệu nền, từ đó cho phép tăng hiệu quả, ngưỡng phát hiện.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó kit này bao gồm các dung dịch MX1, MX2, MX3 và PC với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Môi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Môi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Môi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Môi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Môi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Môi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Môi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Môi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Môi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó: plasmit PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmit PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmit PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmit PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmit PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmit PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmit PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmit PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmit PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmit IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91.

2. Kit theo điểm 1, trong đó các đầu dò độc lập có trong các dung dịch MX1, MX2, MX3 có đầu 5' được gắn chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò.

3. Kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

4. Quy trình sản xuất kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2) và *Mycoplasma genitalium* (MG), trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo các plasmit tái tổ hợp bằng cách phân lập từ *Gardnerella vaginalis* (GV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Candida albicans* (CA), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), virus Herpes simplex 1 (HSV-1), virus Herpes simplex 2 (HSV-2), *Mycoplasma genitalium* (MG) và beta-actin có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 rồi nối vào plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 và biến nạp vào tế bào *E.coli*, sau khi nuôi cấy, chiết tách thu được 10 loại plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.82-91 được ký hiệu là PC_NG (chứa SEQ ID NO.82), PC_NG (chứa SEQ ID NO.83), PC_CT (chứa SEQ ID NO.84), PC_HSV1 (chứa SEQ ID NO.85), PC_CA (chứa SEQ ID NO.86), PC_TV (chứa SEQ ID NO.87), PC_MH (chứa SEQ ID NO.88), PC_HSV-2 (chứa SEQ ID NO.89), PC_MG (chứa SEQ ID NO.90), IC-actin (chứa SEQ ID NO.91), các plasmit này được định lượng đến 10^6 plasmit/ μ l;

b) tổng hợp các đoạn mồi độc lập cho mỗi cặp mồi GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin và chuẩn độ mỗi đoạn mồi này đến nồng độ 100 pmol/ μ l, trong đó:

- cặp mồi GV bao gồm mồi xuôi GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 và mồi ngược GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6;

- cặp mồi NG bao gồm mồi xuôi NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12 và mồi ngược NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15;

- cặp mồi CT bao gồm mồi xuôi CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21 và mồi ngược CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24;

- cặp mồi HSV-1 bao gồm mồi xuôi HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và mồi ngược HSV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33;

- cặp mồi CA bao gồm mồi xuôi CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39 và mồi ngược CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42;

- cặp môi TV bao gồm môi xuôi TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48 và môi ngược TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51;

- cặp môi MH bao gồm môi xuôi MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57 và môi ngược MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60;

- cặp môi HSV-2 bao gồm môi xuôi HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30 và môi ngược HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66;

- cặp môi MG bao gồm môi xuôi MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72 và môi ngược MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75; và

- cặp môi beta-actin bao gồm môi xuôi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.79 và môi ngược beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.80;

c) tổng hợp các đầu dò độc lập GV, NG, CT, HSV-1, CA, TV, MH, HSV-2, MG và beta-actin và gắn vào đầu 5' chất phát huỳnh quang fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) hoặc Cy5 (Cyanine-5), gắn chất dập huỳnh quang ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 của đầu dò và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' của đầu dò và chuẩn độ mỗi đầu dò này đến 10 pmol/μl, trong đó:

- đầu dò GV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9;

- đầu dò NG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18;

- đầu dò CT có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27;

- đầu dò HSV-1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36;

- đầu dò CA có trình tự nêu trong SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45;

- đầu dò TV có trình tự nêu trong SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54;

- đầu dò MH có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63;
- đầu dò HSV-2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69;
- đầu dò MG có trình tự nêu trong SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78;
- và
- đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.81; và

d) tạo kit bằng cách tạo ra các dung dịch MX1, MX2, MX3 và PC với các thành phần sau:

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
1	MX1	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Mồi xuôi GV: SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi NG: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 hoặc SEQ ID NO.12, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi xuôi CT: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 hoặc SEQ ID NO.21, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mồi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Mồi ngược GV: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi ngược NG: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 hoặc SEQ ID NO.15, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
		Mồi ngược CT: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 hoặc SEQ ID NO.24, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và
		Mồi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò GV: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 hoặc SEQ ID NO.9, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò NG: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 hoặc SEQ ID NO.18, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò CT: SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26 hoặc SEQ ID NO.27, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và
		Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
2	MX2	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza;
		Mồi xuôi HSV-1: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;

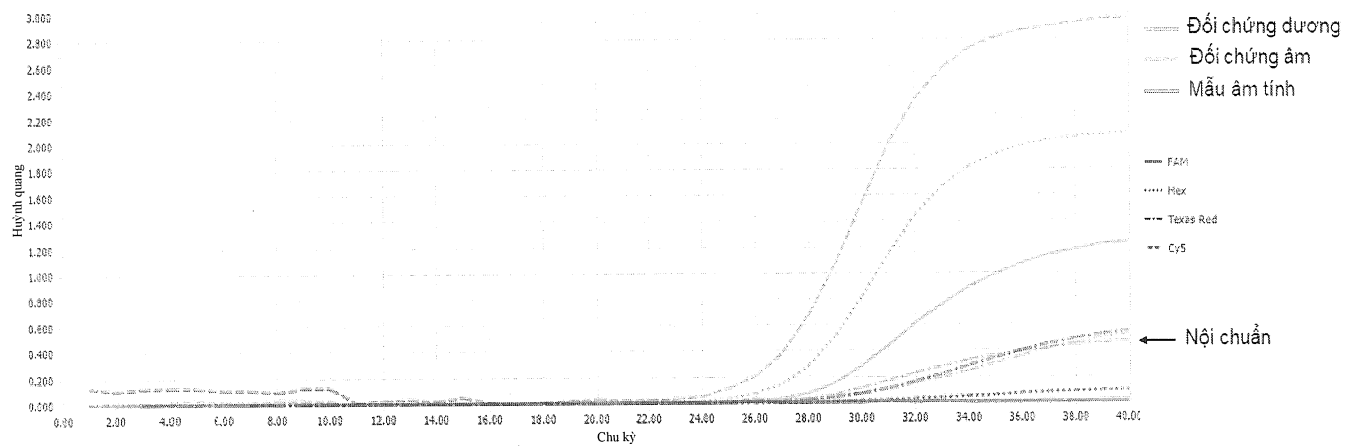
stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Mỗi xuôi CA: SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38 hoặc SEQ ID NO.39, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi TV: SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47 hoặc SEQ ID NO.48, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Mỗi ngược HSV-1: SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32 hoặc SEQ ID NO.33, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược CA: SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 hoặc SEQ ID NO.42, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược TV: SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50 hoặc SEQ ID NO.51, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò HSV-1: SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35 hoặc SEQ ID NO.36, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò CA: SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44 hoặc SEQ ID NO.45, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò TV: SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 hoặc SEQ ID NO.54, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
3	MX3	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza; Mỗi xuôi MH: SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 hoặc SEQ ID NO.57, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi HSV-2: SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29 hoặc SEQ ID NO.30, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi xuôi MG: SEQ ID NO.70, SEQ ID NO.71 hoặc SEQ ID NO.72, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi xuôi beta-actin: SEQ ID NO.79, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Mỗi ngược MH: SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 hoặc SEQ ID NO.60, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược HSV-2: SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65 hoặc SEQ ID NO.66, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; Mỗi ngược MG: SEQ ID NO.73, SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.75, nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; và Mỗi ngược beta-actin: SEQ ID NO.80, nồng độ từ 1 đến 5 pmol/μl;
		Đầu dò MH: SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 hoặc SEQ ID NO.63, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; Đầu dò HSV-2: SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68 hoặc SEQ ID NO.69, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;

stt	Dung dịch	Thành phần, hàm lượng
		Đầu dò MG: SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77 hoặc SEQ ID NO.78, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; và Đầu dò beta-actin: SEQ ID NO.81, nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
4	PC	Dung dịch bao gồm nước khử proteaza chứa 10 loại plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau với lượng 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó: plasmit PC_GV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.82; plasmit PC_NG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.83; plasmit PC_CT chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.84; plasmit PC_HSV-1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.85; plasmit PC_CA chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.86; plasmit PC_TV chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.87; plasmit PC_MH chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.88; plasmit PC_HSV-2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.89; plasmit PC_MG chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.90; và plasmit IC_actin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.91;

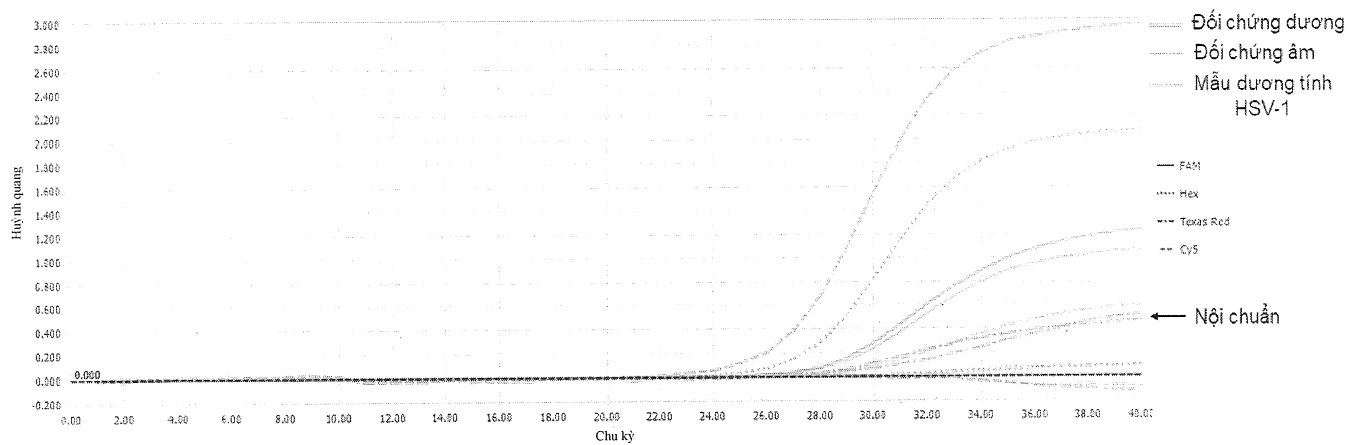
các dung dịch này được đóng trong các lọ độc lập, thu được kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó các dung dịch MX1, MX2, MX3, PC được đựng trong các lọ độc lập và các lọ này còn được đóng gói cùng lọ chứa nước khử proteaza làm đối chứng âm (NC) và tờ hướng dẫn sử dụng kit này để thực hiện PCR nhằm xác định 9 tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục bao gồm vi khuẩn *Gardnerella vaginalis*, vi khuẩn *Neisseria gonorrhoeae*, vi khuẩn *Chlamydia trachomatis*, nấm *Candida albicans*, trùng roi *Trichomonas vaginalis*, vi khuẩn *Mycoplasma hominis*, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2 và vi khuẩn *Mycoplasma genitalium*.

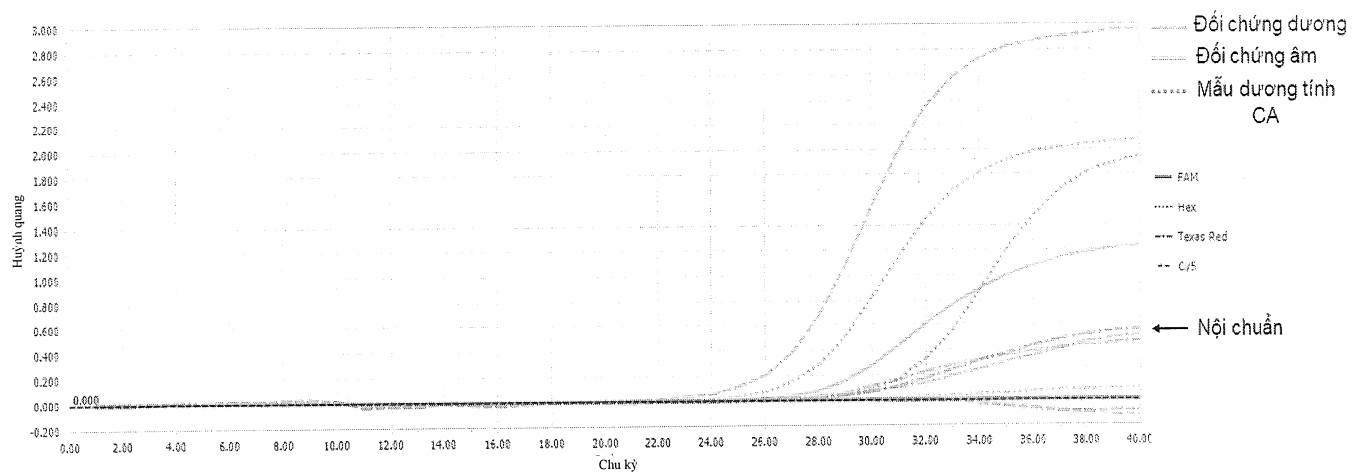
HÌNH 1



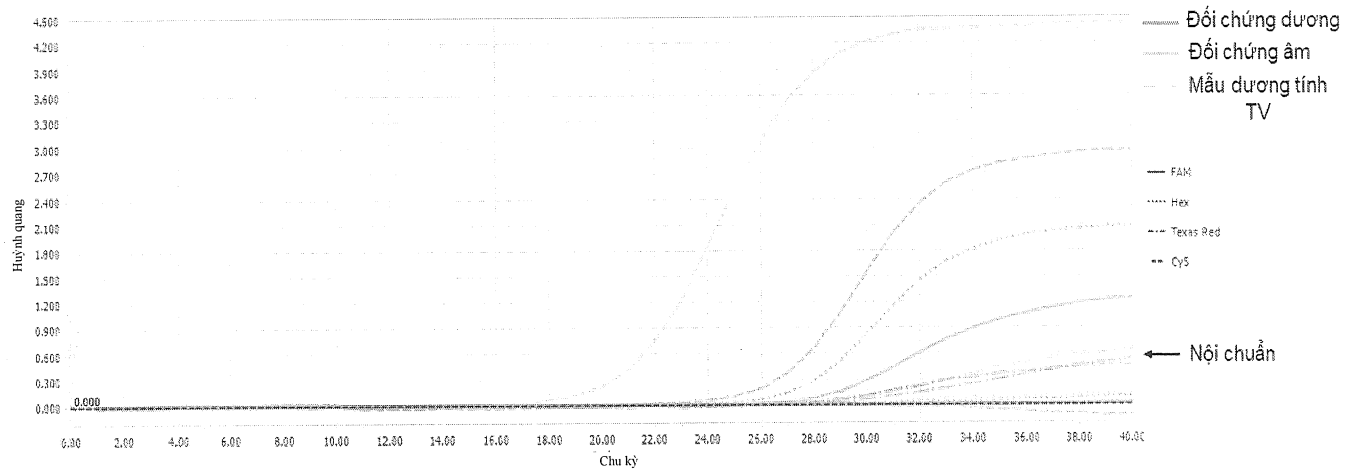
HÌNH 2



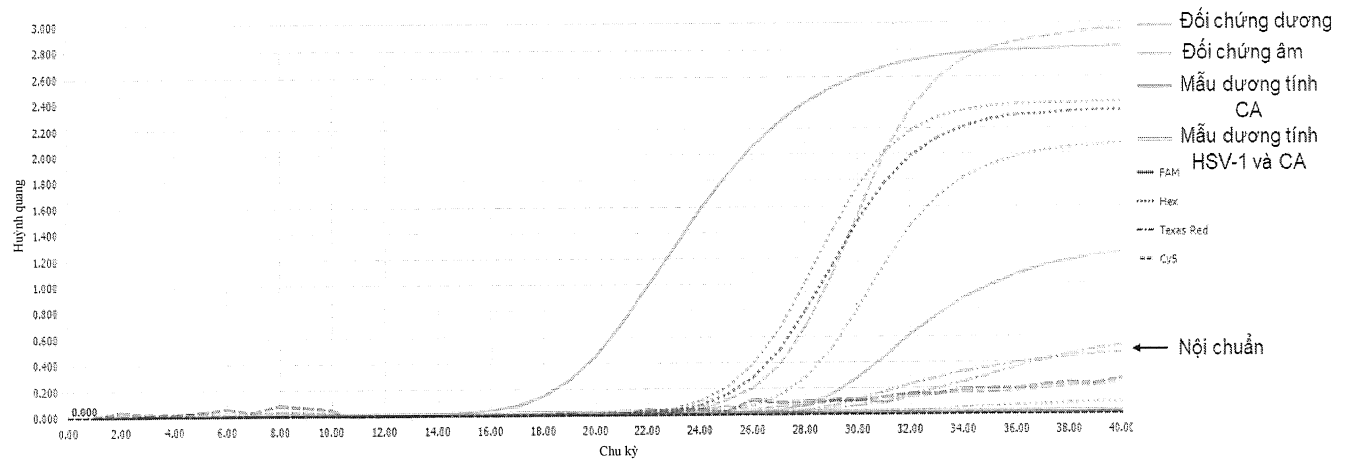
HÌNH 3



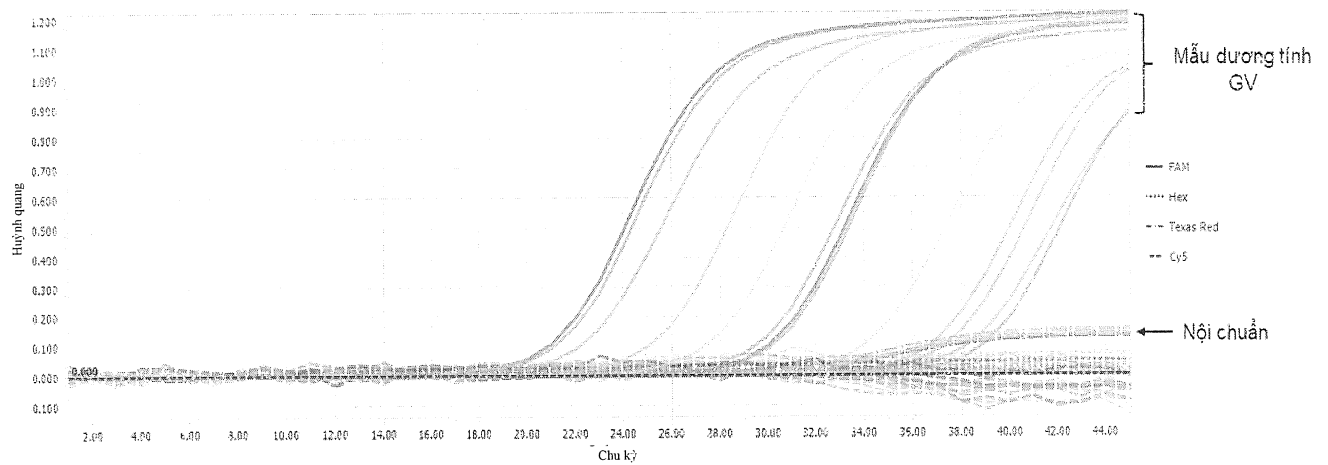
HÌNH 4



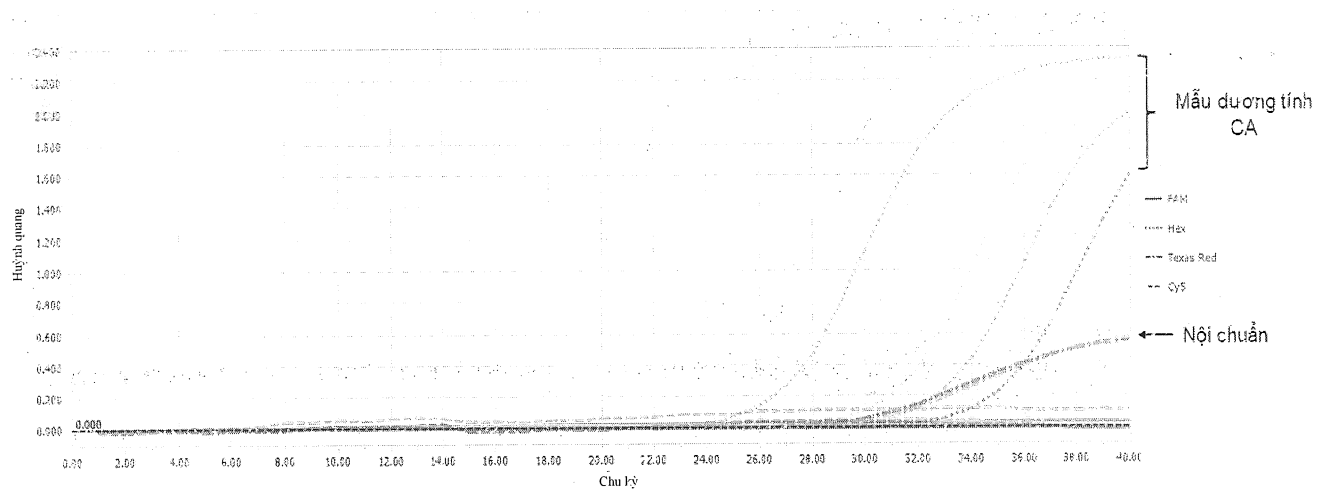
HÌNH 5



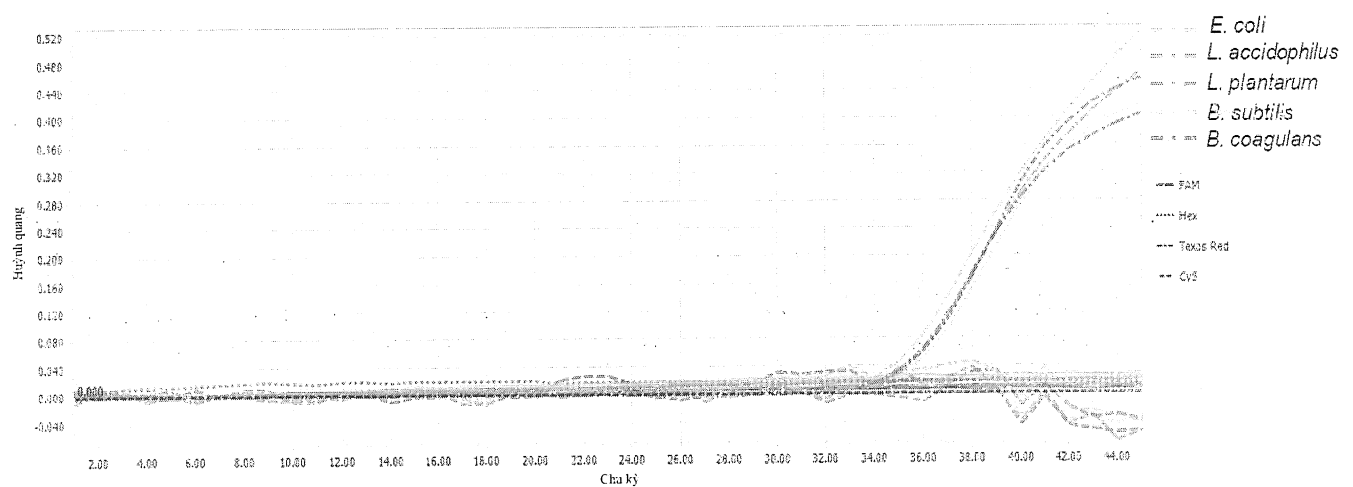
HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
- <120> Kit để xác định tác nhân gây bệnh lây truyền qua đường tình dục và quy trình sản xuất kit này
- <130>
- <160> 91
- <170>
- <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Đoạn môi
- <220> Nhân tạo
- <223>
- <220>
- <400> 1
- GCCATTCTTG ATGCCAAT 18
- <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Đoạn môi
- <220> Nhân tạo
- <223>
- <220>
- <400> 2
- GCCATTCTTG ATGCCAATCG 20
- <210> 3
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Đoạn môi
- <220> Nhân tạo
- <223>
- <220>
- <400> 3
- AAGCCATTCT TGATGCCAAT CGA 23
- <210> 4
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Đoạn môi
- <220> Nhân tạo
- <223>

<220>
 <400> 4
 GGTGTTGATT GGGAGCTTA 19

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 5
 GGGTGTGAT TGGGAGCTTA 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 6
 GGGTGTGAT TGGGAGCTTA CC 22

<210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 7
 TGTGTTACC ATCTCCGGTC GTGG 24

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 8
 TGTGTTACC ATCTCCGGTC GTGGT 25

<210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 9
 TGTGTTTACC ATCTCCGGTC GTGGTA

26

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 10
 AGCATTCAAT TTGTTCCGAG TC

22

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 11
 CAGCATTCAA TTTGTTCCGA GTC

23

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 12
 CAGCATTCAA TTTGTTCCGA GTCA

24

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 13

CGGAAGTGGT TTCATCTGAT TA

22

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 14

CGGAAGTGGT TTCATCTGAT TAC

23

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 15

CGGAAGTGGT TTCATCTGAT TACT

24

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 16

TACGCCTGCT ACTTTCACGC TGG

23

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 17

ATACGCCTGC TACTTTCACG CTGG

24

<210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 18
 CTATACGCCT GCTACTTTCA CGCTGG

26

<210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 19
 TTCAGTTGGG CCAGATCATG CC

22

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 20
 TTCAGTTGGG CCAGATCATG

20

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 21
 TTCAGTTGGG CCAGATCATG C

21

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 22

CTCTTCATCG GTGGCTAATG C

21

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 23

CTCTTCATCG GTGGCTAATG T

21

<210> 24

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 24

CTCTTCATCG GTGGCTAATG TA

22

<210> 25

<211> 25

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 25

AAAAGGCTCG TCCTGACTCA TGCAT

25

<210> 26

<211> 24

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 26

AAAGGCTCGT CCTGACTCAT GCAT

24

<210> 27

<211> 25

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 27

AAAGGCTCGT CCTGACTCAT GCATT

25

<210> 28

<211> 18

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 28

AGCTTGCGGG CCTCGTTC

18

<210> 29

<211> 17

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 29

AGCTTGCGGG CCTCGTT

17

<210> 30

<211> 19

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 30

AGCTTGCGGG CCTCGTTCC

19

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi
<220> Nhân tạo
<223>

<220>
<400> 31
GCAGTTTACG TACAACCACA TACAGCG

27

<210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Đoạn mỗi
<220> Nhân tạo
<223>

<220>
<400> 32
GCAGTTTACG TACAACCACA TACAGC

26

<210> 33
<211> 28
<212> ADN
<213> Đoạn mỗi
<220> Nhân tạo
<223>

<220>
<400> 33
GCAGTTTACG TACAACCACA TACAGCGC

28

<210> 34
<211> 26
<212> ADN
<213> Đoạn mỗi
<220> Nhân tạo
<223>

<220>
<400> 34
CGGCCCAACA TATCGTTGAC ATGGCG

26

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Đoạn mỗi
<220> Nhân tạo
<223>

<220>

<400> 35	
CGGCCCAACA TATCGTTGAC ATGGC	25
<210> 36	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 36	
CGGCCCAACA TATCGTTGAC ATGGG	25
<210> 37	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 37	
GTAGAAGGTC TGCTTCGTAT GA	22
<210> 38	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 38	
GTAGAAGGTC TGCTTCGTAT GG	22
<210> 39	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 39	
GTAGAAGGTC TGCTTCGTAT GGG	23
<210> 40	
<211> 21	

<212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 40
 GTGACTTCAA GTTCGCATAT T

21

<210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 41
 GTGACTTCAA GTTCGCATAT TG

22

<210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 42
 GTGACTTCAA GTTCGCATAT TGC

23

<210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 43
 CCGTGGATGG TTGGCTGTGA GTA

23

<210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>	
<400> 44	
CCGTGGATGG TTGGCTGTGA GTAA	24
<210> 45	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 45	
GCCGTGGATG GTTGGCTGTG AGTAAT	26
<210> 46	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 46	
AACATTGACC ACACGGAC	18
<210> 47	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 47	
AACATTGACC ACACGGACAA	20
<210> 48	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Đoạn mỗi	
<220> Nhân tạo	
<223>	
<220>	
<400> 48	
AACATTGACC ACACGGACAA A	21
<210> 49	

<211> 21

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 49

TTGGAACGTA AAGGCTTCTT C

21

<210> 50

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 50

CTTGGAACGT AAAGGCTTCT TC

22

<210> 51

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 51

CCTTGGAACG TAAAGGCTTC TTC

23

<210> 52

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 52

TCATTTTCGGA TGGTCAAGCA GC

22

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220> <400> 53 TCATTTTCGGA TGGTCAAGCA GCCA	24
<210> 54 <211> 25 <212> ADN <213> Đoạn mỗi <220> Nhân tạo <223>	
<220> <400> 54 TCATTTTCGGA TGGTCAAGCA GCCAA	25
<210> 55 <211> 19 <212> ADN <213> Đoạn mỗi <220> Nhân tạo <223>	
<220> <400> 55 TTTGGTCAAG TCCTGCAAC	19
<210> 56 <211> 21 <212> ADN <213> Đoạn mỗi <220> Nhân tạo <223>	
<220> <400> 56 TTTGGTCAAG TCCTGCAACG A	21
<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Đoạn mỗi <220> Nhân tạo <223>	
<220> <400> 57 TTTGGTCAAG TCCTGCAACG AG	22

<210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 58
 CCCCACCTTC CTCCCAGT

18

<210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 59
 CCCCACCTTC CTCCCAGTTA

20

<210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 60
 TCCCCACCTT CCTCCCAGTT A

21

<210> 61
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 61
 TACTAACATT AAGTTGAGGA CTC

23

<210> 62
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 62

TACTAACATT AAGTTGAGGA CTCTA

25

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 63

TACTAACATT AAGTTGAGGA CTCTAGA

27

<210> 64

<211> 25

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 64

TGCAGTTTAC GTATAACCAC ATACA

25

<210> 65

<211> 27

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 65

TGCAGTTTAC GTATAACCAC ATACAGC

27

<210> 66

<211> 28

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 66

TGCAGTTTAC GTATAACCAC ATACAGCG

28

<210> 67

<211> 20

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 67

CGCCCCAGCA TGTCGTTTCAC

20

<210> 68

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 68

CGCCCCAGCA TGTCGTTTCAC GT

22

<210> 69

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 69

CGCCCCAGCA TGTCGTTTCAC GTG

23

<210> 70

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 70

ATTATGCGCA CCAGTTACTT G

21

<210> 71

<211> 23

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 71

TTATGCGCAC CAGTTACTTG

20

<210> 72

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 72

CATTATGCGC ACCAGTTACT TG

22

<210> 73

<211> 20

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 73

AAGTTCAACT GCAGTAGTTG

20

<210> 74

<211> 21

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 74

AAGTTCAACT GCAGTAGTTG T

21

<210> 75

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 75

AAGTTCAACT GCAGTAGTTG TT

22

<210> 76

<211> 15

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 76

GGTGTGGATC GAGCG

15

<210> 77

<211> 17

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 77

GGTGTGGATC GAGCGGC

17

<210> 78

<211> 18

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 78

GGTGTGGATC GAGCGGCA

18

<210> 79

<211> 18

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220> Nhân tạo

<223>

<220>

<400> 79

TGAGCGCGGC TACAGCTT

18

<210> 80

<211> 22

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 80
 TCCTTAATGT CACGCACGAT TT

22

<210> 81
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Đoạn mỗi
 <220> Nhân tạo
 <223>

<220>
 <400> 81
 CCACCACGGC CGAGCGG

17

<210> 82
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> tuf
 <220> Gardnerella vaginalis
 <223>

<220>
 <400> 82
 AAGCCATTCT TGATGCCAAT CGAAGATGTG TTCACCATCT CCGGTCGTGG TACCGTTGTC 60
 ACCGGTCGTG TTGAGCGTGG TAAGCTCCCA ATCAACACCC CA 102

<210> 83
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> porA pseudogene
 <220> Neisseria gonorrhoeae
 <223>

<220>
 <400> 83
 GGCAGCATTC AATTTGTTCC GAGTCAAAAC AGCAAGTCCG CCTATACGCC TGCTACTTTC 60
 ACGCTGGAAA GTAATCAGAT GAAACCAGTT CCGGC 95

<210> 84
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> trpB
 <220> Chlamydia trachomatis
 <223>

<220>

<400> 84

CCTTCAGTTG GGCCAGATCA TGCCGAAATG CATGAGTCAG GACGAGCCTT TTATACATTA 60
GCCACCGATG AAGAGGC 77

<210> 85

<211> 121

<212> ADN

<213> UL27

<220> Herpes simplex 1

<223>

<220>

<400> 85

TCAGCTTGCG GGCCTCGTTC CACAGGGTCA GCTCGTGATT CTGTAGCTCG CACCACGCGA 60
TGGCAACGCG GCCCAACATA TCGTTGACAT GCGCGCTGTAT GTGGTTGTAC GTAAACTGCA 120
G 121

<210> 86

<211> 104

<212> ADN

<213> ribonuclease P RNA (RPR1)

<220> Candida albicans

<223>

<220>

<400> 86

CTGTAGAAGG TCTGCTTCGT ATGGGAATGG CGCCGTGGAT GGTTGGCTGT GAGTAATTCT 60
TTACTACAAG CTGTTTAGTG CAATATGCGA ACTTGAAGTC ACCT 104

<210> 87

<211> 94

<212> ADN

<213> Repeated DNA target

<220> Trichomonas vaginalis

<223>

<220>

<400> 87

CAAACATTGA CCACACGGAC AAAAAGTGTC ATTTCCGATG GTCAAGCAGC CAATCGCATT 60
CGAGCACTTC GAAGAAGCCT TTACGTTCCA AGGG 94

<210> 88

<211> 105

<212> ADN

<213> Ribosomal ARN operon

<220> Mycoplasma hominis

<223>

<220>

<400> 88

TGTTTGGTCA AGTCCTGCAA CGAGCGCAAC CCCTATCTTT AGTTACTAAC ATTAAGTTGA 60
 GGACTCTAGA GATACTGCCT GGGTAACTGG GAGGAAGGTG GGGAT 105

<210> 89

<211> 121

<212> ADN

<213> UL27

<220> Herpes simplex 2

<223>

<220>

<400> 89

TGAGCTTGCG GGCCTCGTTC CATAGAGTCA GCTCGTGGTT CTGCAGCTCG CACCACGCGA 60
 CGGCGATGCG CCCCAGCATG TCGTTCACGT GCGGCTGTAT GTGGTTGTAC GTAAACTGCA 120
 G 121

<210> 90

<211> 135

<212> ADN

<213> Hypothetical protein

<220> Mycoplasma genitalium

<223>

<220>

<400> 90

CATTATGCGC ACCAGTTACT TGAAAAAAT ACCCATAATG AATAGTGATA GTGATCTAAA 60
 ACTCCAAAAG GTGTGGATCG AGCGGCATGT TGATCAAGAT GAACTTAGTT TAACAACACTAC 120
 TGCAGTTGAA CTAA 135

<210> 91

<211> 23

<212> ADN

<213> beta-actin

<220> Người hiện đại

<223>

<220>

<400> 91

TGAGCGCGGC TACAGCTTCA CCACCACGGC CGAGCGGGAA ATCGTGCGTG ACATTAAGGA 60
 AAGGGCGAAT TCTGCAGATA TCCATCACAC TG 92