



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C12Q 1/68; C12N 15/115; C12N 15/10; (13) B
C12N 15/113



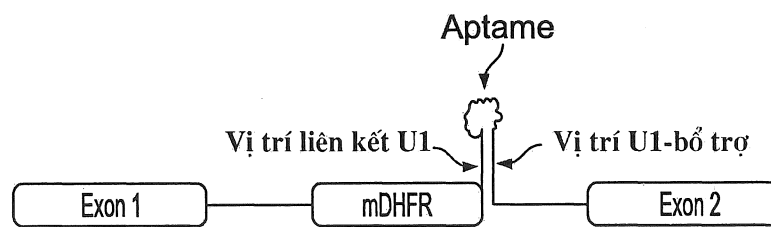
1-0048984

(21) 1-2019-01044 (22) 03/08/2017
(86) PCT/IB2017/001113 03/08/2017 (87) WO 2018/025085 08/02/2018
(30) 62/370,599 03/08/2016 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/06/2019 375A
(73) MEIRAGTX UK II LIMITED (GB)
92 Britannia Walk, London N1 7NQ, United Kingdom
(72) Xuecui GUO (CA); Lei FENG (CN); Alexandria FORBES (US).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC APTAME, APTAME CHỌN LỌC ĐƯỢC THEO
PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC PHỐI TỬ

(21) 1-2019-01044

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc aptame mà liên kết với phối tử ở tế bào nhân chuẩn bằng cách sử dụng catxet polynucleotit nhằm điều hòa sự biểu hiện của gen thông báo. Sáng chế còn đề xuất phương pháp chọn lọc phối tử mà liên kết với aptame ở tế bào nhân chuẩn, và aptame chọn lọc được theo phương pháp nêu trên.



Hình 1a

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các phương pháp sàng lọc để xác định aptame mà liên kết một cách đặc hiệu với phối tử, hoặc phối tử mà liên kết một cách đặc hiệu với aptame, trong tế bào nhân chuẩn bằng cách sử dụng catxet polynucleotit nhằm điều hòa sự biểu hiện của gen thông báo, trong đó catxet polynucleotit chứa công tắc ribo trong phạm vi 5' intron–exon khác–3' intron. Công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame sao cho khi aptame này liên kết với phối tử, thì xảy ra sự biểu hiện của gen thông báo.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ghép nối là quy trình mà theo đó trình tự của intron được lấy ra khỏi tiền ARN thông tin (pre-mRNA) mới sinh và các exon được kết hợp cùng nhau để tạo ra ARN thông tin. Các vị trí ghép nối là chỗ nối giữa các exon và các intron, và được xác định bởi các trình tự liên ứng khác nhau tại đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của intron (tức là, lần lượt vị trí cho nối ghép và vị trí nhận nối ghép). Cách khác ghép nối tiền-ARN thông tin, hoặc cách ghép nối khác, là quy trình phổ biến xuất hiện ở hầu hết gen của người chứa nhiều exon. Nó được thực hiện bởi cấu trúc lớn đa thành phần được gọi là thể ghép nối, mà là bộ sưu tập gồm ribonucleoprotein nhỏ của nhân (small nuclear ribonucleoprotein - snRNP) và mảng khác nhau gồm các protein phụ trợ. Bằng cách nhận diện các trình tự điều hòa cis khác nhau, thể ghép nối xác định các ranh giới exon/intron, loại bỏ các trình tự của intron, và ghép nối các exon với nhau thành thông báo cuối cùng dịch nghĩa được (tức là ARN thông tin). Trong trường hợp cách ghép nối khác, một số exon nhất định có thể được đưa vào hoặc bị loại bỏ để thay đổi thông báo mã hóa cuối cùng bằng cách đó thay đổi protein được biểu hiện tạo ra.

Sáng chế áp dụng việc kiểm soát cách ghép nối khác gián tiếp nhờ phối tử/aptame để xác định các cặp aptame/phối tử mà liên kết trong trường hợp tế bào đích nhân chuẩn. Trước đây, aptame được tạo ra đối với nhiều loại phối tử thông qua sàng lọc *in vitro*, tuy nhiên, ít loại được chứng minh là hiệu quả ở tế bào, làm nổi bật nhu cầu về các hệ để sàng lọc aptame mà hoạt động ở sinh vật được chọn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc aptame mà liên kết phôi tử trong các tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện aptame,
- (b) đưa các thành viên của thư viện aptame này vào catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phôi tử nhằm tạo ra thư viện công tắc ribo,
- (c) đưa thư viện công tắc riboes này vào các tế bào nhân chuẩn, và
- (d) cho tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với phôi tử, và
- (e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo,

trong đó catxet polynucleotit chứa exon ghép nối theo cách khác, được bọc sườn bởi intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3', và công tắc ribo chứa (i) vùng tác động có thân mà bao gồm vị trí ghép nối 5' của intron ở đầu tận cùng 3', và (ii) aptame, trong đó exon ghép nối theo cách khác chứa codon dừng mà nằm trong cùng khung với gen thông báo khi exon ghép nối theo cách khác được ghép nối vào ARN thông tin của gen thông báo.

Theo một phương án, thư viện aptame này chứa các aptame có một hoặc nhiều nucleotit ngẫu nhiên. Theo một phương án, thư viện aptame này chứa các aptame có các trình tự hoàn toàn ngẫu nhiên. Theo một phương án, thư viện aptame này chứa các aptame mà có chiều dài từ 15 đến 200 nucleotit. Theo một phương án, thư viện aptame này chứa các aptame mà có chiều dài từ 30 đến 100 nucleotit. Theo một phương án, thư viện aptame này chứa nhiều hơn 100.000 aptame. Theo một phương án, thư viện aptame này chứa nhiều hơn 1.000.000 aptame.

Theo một phương án, phôi tử là phân tử nhỏ. Theo một phương án, phôi tử phân tử nhỏ là ngoại sinh đối với tế bào nhân chuẩn. Theo một phương án khác, phôi tử là phân tử tạo ra bởi tế bào nhân chuẩn bao gồm, ví dụ, chất chuyển hóa, axit nucleic, vitamin, đồng tác nhân, lipid, monosacarit, và thể mang thông tin thứ hai.

Theo một phương án, tế bào nhân chuẩn được chọn từ tế bào của động vật có vú, tế bào của côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào nấm men. Theo một phương án, tế bào nhân chuẩn thu được từ chuột, người, ruồi (ví dụ, *Drosophila melanogaster*), cá (ví dụ, *Danio rerio*) hoặc giun tròn (ví dụ, *Caenorhabditis elegans*).

Theo một phương án, gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm protein huỳnh quang, luxiferaza, β -galactosidaza và peroxidaza của cây củ cải cay. Theo một phương án, gen thông báo là xytokin, phân tử phát tín hiệu, hormon sinh trưởng, kháng thể, ARN điều hòa, protein có hoạt tính điều trị, hoặc peptit. Theo một phương án, sự biểu hiện của gen thông báo lớn hơn khoảng 10 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu aptame so với mức độ biểu hiện của gen thông báo khi phối tử không có mặt. Theo một phương án khác nữa, sự biểu hiện của gen thông báo cao gấp khoảng 20, 50, 100, 200, 500, hoặc 1.000 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu aptame so với mức độ biểu hiện của gen thông báo khi phối tử không có mặt.

Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' thu được từ intron 2 của gen β -globin của người. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' chứa codon dừng trong cùng khung với gen đích. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 50 nucleotit đến 300 nucleotit. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 125 nucleotit đến 240 nucleotit. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và/hoặc intron ở đầu tận cùng 3' đã được cải biến để bao gồm, hoặc làm thay đổi trình tự của, gen tăng cường ghép nối intron, gen tăng cường ghép nối intron, vị trí ghép nối 5', vị trí ghép nối 3', hoặc trình tự điểm nhánh.

Theo một phương án, thân của vùng tác động của công tắc ribo có chiều dài khoảng 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ. Theo một phương án, thân của vùng tác động có chiều dài từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ.

Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác thu được từ exon 2 của gen dihydrofolat reductaza (DHFR) của người, exon 5 đột biến của khối u Wilms 1 của người, exon 16 của protein kinaza II delta phụ thuộc canxi/calmodulin của chuột, hoặc SIRT1 exon 6. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác là DHFR exon 2 đã được cải biến. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác được cải biến ở một hoặc nhiều nhóm bao gồm việc làm thay đổi trình tự của gen làm câm ghép nối exon, làm thay đổi trình tự của gen tăng cường ghép nối exon, bổ sung gen tăng cường ghép nối exon vào, và bổ sung thể cho ghép nối exon vào. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác là loại tổng hợp (tức là không thu được từ exon có trong tự nhiên).

Theo một phương án, thư viện aptame được chia thành thư viện aptame nhỏ hơn trước khi đưa các catxet polynucleotit vào, bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa, trong đó các aptame trong thư viện này bao gồm nhiều vùng ổn định 5' và 3' và một hoặc nhiều nucleotit ngẫu nhiên,
- (b) thực hiện PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa làm khuôn và đoạn mỗi thứ nhất và đoạn mỗi thứ hai mà là bổ trợ cho các vùng ổn định 5' và 3',
- (c) phân lập các sản phẩm của PCR hai chu kỳ, và
- (d) khuếch đại theo phương pháp PCR phân nhóm bao gồm các sản phẩm đã được phân lập của PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng nhiều đoạn mỗi bổ trợ cho phân nhóm bao gồm các vùng ổn định 5' và 3' độc nhất.

Theo một phương án, thư viện công tắc ribo được chia thành một hoặc nhiều thư viện phụ công tắc ribo trước khi được đưa vào tế bào nhân chuẩn. Theo một phương án, phương pháp chia thư viện công tắc ribo thành các thư viện phụ bao gồm các bước:

- (a) đưa thư viện aptame vào plasmit chứa catxet polynucleotit điều hòa của gen để tạo ra thư viện công tắc ribo;
- (b) đưa thư viện công tắc ribo vào vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*); và
- (c) gom các dòng vi khuẩn (ví dụ, bằng cách nhặt các khuẩn lạc của vi khuẩn) và chiết ADN của plasmit để thu được thư viện phụ công tắc ribo của plasmit (trong bản mô tả này còn được gọi là thư viện phụ sơ khai);

Theo các phương án, thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp được tạo ra từ thư viện phụ sơ khai gồm các công tắc ribo của plasmit bằng cách đưa thư viện phụ sơ khai vào vi khuẩn, gom các dòng vi khuẩn và phân lập ADN của plasmit. Sau đó, thư viện phụ sơ khai hoặc thứ cấp được đưa vào các tế bào nhân chuẩn, các tế bào nhân chuẩn đã tiếp xúc với phối tử, và mức độ biểu hiện của gen thông báo được đo để xác định liệu một hoặc nhiều aptame trong thư viện này liên kết phối tử trong phạm vi tế bào nhân chuẩn.

Theo một phương án, sáng chế bao gồm aptame mà liên kết với phối tử đích, trong đó aptame được chọn theo các phương pháp nêu trên. Theo các phương án của sáng chế, aptame chứa trình tự SEQ ID NO: 14 đến 27. Theo một phương án, aptame trình tự chứa trình tự SEQ ID NO:24.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc phối tử mà liên kết aptame trong tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện gồm các phối tử,
- (b) chuẩn bị catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử,
- (c) đưa catxet polynucleotit vào tế bào nhân chuẩn,
- (d) cho từng nhóm tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với các thành viên của thư viện phối tử này, và
- (e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo,

trong đó catxet polynucleotit chứa exon ghép nối theo cách khác, được bọc sườn bởi intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3', và công tắc ribo chứa (i) vùng tác động có thân mà bao gồm vị trí ghép nối 5' của intron ở đầu tận cùng 3', và (ii) aptame, trong đó exon ghép nối theo cách khác chứa codon dừng mà nằm trong cùng khung với gen thông báo khi exon ghép nối theo cách khác được ghép nối vào ARN thông tin của gen thông báo.

Theo một phương án, phối tử là phân tử nhỏ. Theo một phương án, phối tử phân tử nhỏ là ngoại sinh đối với tế bào nhân chuẩn. Theo một phương án khác, phối tử là phân tử mà được tạo ra bởi tế bào nhân chuẩn bao gồm, ví dụ, chất chuyển hóa, axit nucleic, vitamin, đồng tác nhân, lipid, monosacarit, và thể mang thông tin thứ hai.

Theo một phương án, tế bào nhân chuẩn được chọn từ tế bào của động vật có vú, tế bào của côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào nấm men. Theo một phương án, tế bào nhân chuẩn thu được từ chuột, người, ruồi (ví dụ, *Drosophila melanogaster*), cá (ví dụ, *Danio rerio*) hoặc giun tròn (ví dụ, *Caenorhabditis elegans*).

Theo một phương án, gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm protein huỳnh quang, luxiferaza, β -galactosidaza và peroxidaza của cây củ cải cay. Theo một phương án, gen thông báo là xytokin, phân tử phát tín hiệu, hormon sinh trưởng, kháng thể, ARN điều hòa, protein có hoạt tính điều trị, hoặc peptit. Theo một phương án, mức độ biểu hiện của gen thông báo lớn hơn khoảng 10 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu với aptame so với mức độ biểu hiện của gen thông báo khi phối tử không có mặt. Theo một phương án khác nữa, mức độ biểu hiện của gen thông báo cao gấp khoảng 20, 50, 100, 200, 500, hoặc 1.000 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu với aptame so với mức độ biểu hiện của các gen thông báo khi phối tử không có mặt.

Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' thu được từ intron 2 của gen β -globin của người. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng

5' chứa codon dừng trong cùng khung với gen đích. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 50 nucleotit đến 300 nucleotit. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 125 nucleotit đến 240 nucleotit. Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' và/hoặc intron ở đầu tận cùng 3' đã được cải biến để bao gồm, hoặc làm thay đổi trình tự của, gen tăng cường ghép nối intron, gen tăng cường ghép nối exon, vị trí ghép nối 5', vị trí ghép nối 3', hoặc trình tự điểm nhánh.

Theo một phương án, thân của vùng tác động của công tắc ribo có chiều dài khoảng từ 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ. Theo một phương án, thân của vùng tác động có chiều dài từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ.

Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác thu được từ exon 2 của gen dihydrofolat reductaza (DHFR) của người, exon 5 đột biến của khối u Wilms 1 của người, exon 16 của protein kinaza II delta phụ thuộc canxi/calmodulin của chuột, hoặc SIRT1 exon 6. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác là DHFR exon 2 đã được cải biến. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác được cải biến ở một hoặc nhiều nhóm bao gồm việc làm thay đổi trình tự của gen làm câm ghép nối exon, việc làm thay đổi trình tự của gen tăng cường ghép nối exon, việc bổ sung gen tăng cường ghép nối exon vào, và bổ sung thể cho ghép nối exon vào. Theo một phương án, exon ghép nối theo cách khác là loại tổng hợp (tức là không thu được từ exon có trong tự nhiên).

Theo một phương án, sáng chế bao gồm phối tử chọn được theo các phương pháp nêu trên.

Theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất phương pháp tách thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa thành các thư viện phụ aptame nhỏ hơn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa, trong đó các aptame trong thư viện này bao gồm nhiều vùng ổn định 5' và 3' và một hoặc nhiều nucleotit ngẫu nhiên,
- (b) thực hiện PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa làm khuôn và các đoạn mỗi thứ nhất và các đoạn mỗi thứ hai mà là hỗ trợ cho các vùng ổn định 5' và 3',
- (c) phân lập các sản phẩm của PCR hai chu kỳ, và

(d) khuếch đại theo phương pháp PCR phân nhóm bao gồm các sản phẩm đã được phân lập của PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng các đoạn mồi hỗ trợ cho phân nhóm bao gồm các vùng ổn định 5' và 3' độc nhất.

Theo một phương án, thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa chứa các aptame có một hoặc nhiều nucleotit ngẫu nhiên. Theo một phương án, thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa chứa khoảng nhiều hơn 100.000 aptame. Theo một phương án, thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa chứa khoảng nhiều hơn 1.000.000 aptame.

Theo một phương án, đoạn mồi thứ nhất hoặc thứ hai trong PCR hai chu kỳ chứa nhãn được chọn từ nhóm bao gồm biotin, digoxigenin (DIG), bromodeoxyuridin (BrdU), nhóm huỳnh quang, nhóm hóa học, ví dụ nhóm thiol, hoặc nhóm hóa học ví dụ azit được dùng trong hóa học Click.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1a là sơ đồ về cấu trúc công tắc ribo. Trình tự beta-globin intron đã bị cắt cụt được cài xen vào trình tự mã hóa của gen thông báo, và codon dừng đột biến chứa DHFR exon 2 (mDHFR) được đặt vào intron đã được cài xen vào, do đó tạo ra nền tảng biểu hiện gen gồm ba exon mà theo đó sự biểu hiện của gen thông báo được điều tiết bằng cách đưa vào/loại bỏ mDHFR exon. Cấu trúc kẹp tóc/thân được tạo ra bao gồm vị trí liên kết U1 ở intron nằm sau (3') mDHFR exon với trình tự đã được xử lý hỗ trợ cho vị trí liên kết U1, mà phong bế liên kết U1, nhờ đó dẫn đến việc loại bỏ codon dừng chứa mDHFR exon và biểu hiện gen đích. Trình tự của aptame được ghép ở giữa vị trí liên kết U1 và trình tự hỗ trợ của nó, cho phép kiểm soát sự hình thành kẹp tóc bởi sự liên kết của aptame/phối tử.

Hình 1b là đồ thị về mức đáp ứng theo liều của các cấu trúc có catxet điều hòa chứa các công tắc ribo khác trên cơ sở aptame. Các công tắc ribo guanin gây biểu hiện gen thông báo bằng cách đáp ứng không chỉ với xử lý bằng guanin mà cả xử lý bằng guanosin.

Hình 1c và 1d là đồ thị thể hiện rằng công tắc ribo xpt-G17 cảm ứng hoạt tính của luxiferaza khi xử lý bằng các chất tương tự guanin.

Hình 1e là đồ thị thể hiện số lần tăng hoạt tính của luxiferaza nhờ công tắc ribo xpt-G17 khi xử lý bằng các hợp chất.

Hình 2 là sơ đồ về khuôn để tạo ra các trình tự của aptame đã được ngẫu nhiên hóa. Trình tự của aptame (thanh rỗng) được bọc sườn bởi các vùng ổn định (các thanh màu đen), mà chứa vị trí BsaI để tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhân dòng aptame vào catxet điều hòa gen để tạo ra các công tắc ribo.

Hình 3a đến 3e là các sơ đồ mô tả về phương pháp tách thư viện lớn gồm các aptame đã được ngẫu nhiên hóa thành thành các thư viện phụ nhỏ hơn.

Hình 3a là giản đồ của cách thức gồm 2 bước để tách thư viện aptame lớn. Bước thứ nhất là bổ sung cặp duy nhất thẻ đánh dấu trình tự vào từng khuôn oligonucleotit của aptame. Tiếp sau bước thứ nhất, các khuôn với các trình tự thẻ đánh dấu duy nhất được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà là đặc hiệu với các trình tự đã được gắn thẻ đánh dấu.

Hình 3b thể hiện ba hướng để gắn các trình tự thẻ đánh dấu vào các khuôn: các trình tự thẻ đánh dấu đã được kết hợp vào thông qua PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà chứa các trình tự thẻ đánh dấu ở đầu tận cùng 5' của các đoạn mồi (I); các trình tự thẻ đánh dấu được gắn vào bằng cách buộc trình tự khuôn đơn sợi vào các trình tự thẻ đánh dấu đơn sợi nhờ T4 ARN ligaza (II); các trình tự thẻ đánh dấu được liên kết với các khuôn bằng cách buộc các trình tự khuôn sợi đôi với trình tự thẻ đánh dấu sợi đôi nhờ T4 ADN ligaza (III).

Hình 3c là biểu đồ của PCR hai chu kỳ. Đối với chu kỳ 1, chỉ các đoạn mồi ngược JR mà chứa trình tự thẻ đánh dấu ở đầu tận cùng 5'. Sau chu kỳ thứ nhất, sợi mới được tổng hợp có trình tự thẻ đánh dấu ở đầu tận cùng 5' của nó. Đối với chu kỳ 2, đoạn mồi xuôi JF đã được đánh dấu bằng biotin được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng PCR, mà chỉ có thể sử dụng sợi mới được tổng hợp làm khuôn, do đó tạo ra khuôn với các trình tự thẻ đánh dấu ở cả đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' và phân tử biotin ở đầu tận cùng 5'.

Hình 3d minh họa quá trình tạo ra thư viện aptame đã được gắn thẻ đánh dấu. Sau khi gắn nhãn cho các khuôn bằng các thẻ đánh dấu trình tự và phân tử biotin, hạt streptavidin được sử dụng để tách các khuôn sợi đơn đã được đánh dấu/đã được gắn thẻ đánh dấu ra khỏi phần còn lại của các thành phần phản ứng thông qua việc làm biến tính các oligo và rửa các hạt. Tiếp đó, các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu được khuếch đại và được mở rộng bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm các đoạn mồi (các đoạn mồi F và R) mà là đặc hiệu với các trình tự đã được gắn thẻ đánh dấu, do đó tạo ra thư viện aptame đã được gắn thẻ đánh dấu mà là sẵn sàng cho PCR tiếp theo bằng cách sử dụng một cặp đoạn

mỗi đặc hiệu với trình tự thẻ đánh dấu để tạo ra thư viện phụ của thư viện aptame ban đầu.

Hình 3e là các thư viện phụ aptame được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách áp dụng cách tách. thư viện aptame (10^6 , tạo ra được như trong Ví dụ 2) được gắn thẻ đánh dấu theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng 2 đoạn môi xuôi (JF1-2) và 8 đoạn môi ngược (JR1-8), với số bản sao khuôn ở 1, 2,3 hoặc 4,6. Các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu và đã được phân lập được mở rộng bằng hỗn hợp gồm các đoạn môi F1-2 và R1-8 đặc hiệu với thẻ đánh dấu, và các sản phẩm PCR được đưa đến PCR với các đoạn môi phổ biến (mảng bên trái), một cặp đoạn môi đặc hiệu với thẻ đánh dấu F1 và R1 (mảng giữa), hoặc một cặp đoạn môi không liên quan của F3 và R1 (mảng bên phải). Nước được dùng làm đối chứng trống cho các khuôn.

Hình 4 minh họa thí nghiệm về độ nhạy trên thử nghiệm trên cơ sở tế bào đối với sàng lọc thư viện công tắc ribo. Cấu trúc xpt-G17 được trộn với cấu trúc SR-mut theo tỷ lệ phân tử khác nhau, và ADN của cấu trúc đã trộn được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK-293 và xử lý bằng guanin. Số lần gia tăng hoạt tính của luxiferaza được tính theo hoạt tính của luxiferaza cảm ứng được nhờ guanin chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được khi không xử lý bằng guanin.

Hình 5a là biểu đồ thể hiện việc xây dựng thư viện plasmit chứa công tắc ribo. Các oligo aptame đơn sợi trước tiên được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi phổ biến để chuyển hóa khuôn aptame đơn sợi thành sợi đôi. Tiếp đó, các oligo sợi đôi được tiêu bằng BsaI và được buộc vào vật truyền bị tiêu bởi BsaI để tạo ra các cấu trúc với công tắc ribo. Tiếp đó, ADN của plasmit được đập lỗ bằng xung điện thành tế bào DH5a khá về mặt điện. Nhiều hơn 5×10^6 khuẩn lạc được gom để bao trùm nhiều hơn 99% thư viện aptame ban đầu (10^6).

Hình 5b là biểu đồ của việc chia thư viện plasmit gồm các công tắc ribo thành các thư viện phụ. Thư viện plasmit gồm các công tắc ribo được biến nạp thành các tế bào DH5a có năng lực về mặt hóa học. Tiếp đó, vi khuẩn đã biến nạp được cấy vào các đĩa aga. Số lượng nhất định khuẩn lạc của vi khuẩn được gom từ từng đĩa aga riêng rẽ và ADN plasmit được chiết từ từng bộ gom khuẩn lạc riêng rẽ. ADN plasmit thu được từ từng bộ gom khuẩn lạc tạo nên thư viện phụ gồm các công tắc ribo. Cách chia này có thể được lặp lại cho đến khi đạt được kích thước mong muốn của thư viện phụ.

Hình 5c thể hiện thành phần trình tự duy nhất của thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp được xác định bằng giải trình tự thế hệ tiếp theo (Next Generation Sequencing). Các trình tự với nhiều hơn 12 lần đọc từ việc chạy giải trình tự được xem là các trình tự đúng.

Hình 5d thể hiện việc so sánh thành phần trình tự duy nhất giữa hai thư viện phụ thứ cấp mà được tạo ra từ cùng thư viện phụ sơ khai P1S_003. Biểu đồ tròn biểu thị số lượng trình tự duy nhất trong từng thư viện phụ và số lượng trình tự chồng lấn giữa hai thư viện công tắc ribo.

Hình 5e thể hiện sự so sánh thành phần trình tự duy nhất giữa hai thư viện phụ thứ cấp mà được tạo ra từ các thư viện phụ sơ khai khác nhau, lần lượt là P1S_003 và P1S_007. Biểu đồ tròn biểu thị số lượng trình tự duy nhất trong từng thư viện phụ và số lượng trình tự chồng lấn giữa hai thư viện công tắc ribo.

Hình 6a và hình 6b thể hiện ADN plasmit từ 6 trong số 100 thư viện phụ sơ khai (60k) (hình 6a) hoặc 100 thư viện phụ thứ cấp (cỡ 600) (hình 6b) được tạo mảng theo định dạng của đĩa loại 96 lỗ, và được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK-293. Số lần tăng hoạt tính của luxiferaza được tính theo hoạt tính của luxiferaza cảm ứng được nhờ guanin chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được không xử lý bằng guanin.

Hình 6c thể hiện kết quả sàng lọc thư viện phụ công tắc ribo bằng cách sử dụng nicotinamit adenin dinucleotit (NAD⁺) làm phối tử. Thư viện phụ của thư viện công tắc ribo P2 được tạo mảng trong đĩa loại 96 lỗ. các tế bào HEK 293 được cấy vào đĩa loại 96 lỗ và chuyển nhiễm bằng ADN của thư viện công tắc ribo. Bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được xử lý bằng 100 μ M NAD⁺. Hoạt tính của luxiferaza được đo 20 giờ sau khi xử lý bằng NAD⁺. Số lần tăng được tính theo tỷ lệ giữa hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào đã được xử lý bằng NAD⁺ chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào không xử lý bằng NAD⁺. Mỗi điểm trên đồ thị điểm thể hiện số lần tăng so với thư viện phụ hoặc cấu trúc G17 như đã nêu.

Hình 6d thể hiện kết quả của sàng lọc công tắc ribo bằng cách sử dụng NAD⁺ làm phối tử. Từng cấu trúc công tắc ribo riêng rẽ được tạo mảng theo định dạng 96 lỗ. Các tế bào HEK 293 được cấy vào đĩa loại 96 lỗ và chuyển nhiễm bằng cấu trúc công tắc ribo. 4 giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được xử lý bằng 100 μ M NAD⁺. Hoạt tính của luxiferaza được đo 20 giờ sau khi xử lý bằng NAD⁺. Số lần tăng được tính theo tỷ lệ giữa hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào đã được xử lý bằng NAD⁺ chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào không xử lý bằng NAD⁺. Mỗi điểm trên đồ thị

điểm thể hiện số lần tăng so với từng cấu trúc công tắc ribo đơn hoặc cấu trúc G17 như đã nêu.

Hình 6e và hình 6f thể hiện cấu trúc với trình tự aptame mới thể hiện đáp ứng cao hơn đối với xử lý bằng NAD⁺ theo cách phụ thuộc vào liều lượng so với công tắc ribo G17. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với G17 hoặc cấu trúc #46 với trình tự aptame mới. 4 giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được xử lý bằng các liều khác nhau của NAD⁺. Hoạt tính của luxiferaza được đo 20 giờ sau khi xử lý bằng NAD⁺. Số lần tăng được tính theo tỷ lệ giữa hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào đã được xử lý bằng NAD⁺ chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được từ các tế bào không xử lý bằng NAD⁺.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp sàng lọc aptame/phối tử

Sáng chế đề xuất các phương pháp sàng lọc xác định các aptame mà liên kết với phối tử, và các phối tử mà liên kết với aptame, trong phạm vi tế bào nhân chuẩn, mô, hoặc sinh vật. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc aptame mà liên kết phối tử trong các tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện aptame,
- (b) đưa các thành viên của thư viện aptame này vào các catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử,
- (c) đưa aptame chứa các catxet polynucleotit vào các tế bào nhân chuẩn, và
- (d) cho tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với phối tử, và
- (e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc phối tử mà liên kết aptame trong tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện gồm các phối tử,
- (b) chuẩn bị catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử,
- (c) đưa catxet polynucleotit vào tế bào nhân chuẩn,
- (d) cho từng nhóm tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với các thành viên của thư viện phối tử này, và

(e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp xác định các aptame mà liên kết với các phân tử nội bào bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện aptame,
- (b) đưa các thành viên của thư viện aptame này vào các catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử,
- (c) đưa aptame chứa các catxet polynucleotit vào các tế bào nhân chuẩn, và
- (d) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo.

Các phương pháp sàng lọc theo sáng chế sử dụng các catxet polynucleotit điều hòa gen đã bộc lộ trong đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2016/016234, mà được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Các catxet điều hòa gen này bao gồm công tắc ribo trong phạm vi intron ở đầu tận cùng 5' intron–exon khác–3' intron. Thuật ngữ catxet điều hòa gen được dùng để chỉ cấu trúc ADN tái tổ hợp mà, khi được kết hợp vào ADN của gen đích (ví dụ, gen thông báo), đem lại khả năng điều hòa mức độ biểu hiện của gen đích nhờ cách ghép nối khác gián tiếp qua aptame/phối tử đối với tiền-ARN thông tin tạo ra. Catxet điều hòa gen còn chứa công tắc ribo chứa vùng cảm biến (ví dụ, aptame) và vùng tác động cùng nhau chịu trách nhiệm về cảm biến sự có mặt của phối tử mà liên kết với aptame và làm thay đổi ghép nối với exon khác. Các công tắc ribo dẫn bởi aptame này điều hòa mức độ biểu hiện gen của động vật có vú tăng gấp 2 lần đến 2000 lần, đáp ứng việc điều trị bệnh bằng phối tử mà liên kết với aptame. Khoảng điều hòa động lực cao chưa từng có của công tắc ribo tổng hợp này được dùng trong các phương pháp theo sáng chế để tạo ra các hệ sàng lọc cho các aptame mới đối với các loại phối tử mong muốn, cũng như cho các phối tử tối ưu đối với aptame mới và aptame đã biết trong tế bào, các mô và các sinh vật.

Công tắc ribo

Thuật ngữ “công tắc ribo” được dùng trong bản mô tả này để chỉ đoạn điều hòa của polynucleotit ARN (hoặc ADN mã hóa polynucleotit ARN). Công tắc ribo trong phạm vi của sáng chế chứa vùng cảm biến (ví dụ, aptame) và vùng tác động cùng nhau chịu trách nhiệm về cảm biến sự có mặt của phối tử (ví dụ, phân tử nhỏ) và làm thay đổi ghép nối với exon khác. Theo một phương án, công tắc ribo là tái tổ hợp, sử dụng các polynucleotit từ hai hoặc nhiều nguồn. Thuật ngữ “tổng hợp” được dùng trong bản mô tả

này liên quan đến công tắc ribo để chỉ công tắc ribo mà không có trong tự nhiên. Theo một phương án, vùng cảm biến và vùng tác động được kết hợp bởi nhóm liên kết polynucleotit. Theo một phương án, nhóm liên kết polynucleotit tạo nên thân ARN (tức là một vùng của polynucleotit ARN mà là sợi đôi).

Thư viện công tắc ribo như được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm nhiều trình tự aptame mà khác biệt bởi một hoặc nhiều nucleotit liên quan đến các catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử. Do đó, mỗi aptame trong thư viện, cùng với vùng cảm biến, là liên quan đến intron ở đầu tận cùng 5' intron–exon khác–3' intron như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Vùng tác động

Theo một phương án, vùng tác động chứa vị trí ghép nối 5' ("5' ss") trình tự của intron ở đầu tận cùng 3' (tức là trình tự vị trí ghép nối của intron là ngay đầu tận cùng 3' của exon khác). Vùng tác động chứa trình tự 5' ss của intron ở đầu tận cùng 3' và trình tự hỗ trợ cho trình tự 5' ss của intron ở đầu tận cùng 3'. Khi aptame này liên kết với phối tử của nó, vùng tác động tạo nên thân và do đó ngăn ngừa ghép nối với vị trí của thể cho ghép nối ở đầu tận cùng 3' của exon khác. Trong một số điều kiện nhất định (ví dụ, khi aptame không liên kết với phối tử của nó), vùng tác động ở trong điều kiện tiếp cận với vị trí của thể cho ghép nối ở đầu tận cùng 3' của exon khác dẫn đến việc đưa exon khác vào ARN thông tin của gen đích.

Phần thân của vùng tác động nên đủ dài (và chứa đủ lượng GC) để hầu như ngăn ngừa sự ghép nối khác exon khác sau khi liên kết với phối tử của aptame, trong khi còn cho phép tiếp cận đến vị trí ghép nối khi phối tử có mặt với lượng không đủ. Theo các phương án của sáng chế, phần thân vùng tác động chứa trình tự thân ngoài trình tự 5' ss của intron ở đầu tận cùng 3' và trình tự hỗ trợ của nó. Theo các phương án của sáng chế, trình tự thân bổ sung này chứa trình tự từ thân aptame. Chiều dài và trình tự của phần thân có thể được cải biến bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết để xác định các thân mà cho phép sự biểu hiện nền ở mức chấp nhận được của gen đích khi phối tử không có mặt và sự biểu hiện của gen đích ở mức chấp nhận được khi phối tử có mặt. Ví dụ, nếu thân là quá dài, thì nó có thể giấu tiếp cận đến trình tự 5' ss của intron ở đầu tận cùng 3' khi có hoặc không có phối tử. Nếu thân là quá ngắn, thì nó có thể không tạo nên thân ổn định có khả năng tách trình tự 5' ss của intron ở đầu tận cùng 3', trong trường hợp đó exon khác sẽ được ghép nối vào gen đích thông tin khi có hoặc không có phối tử. Theo một phương

án, tổng chiều dài của thân của vùng tác động nằm trong khoảng từ 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ. Theo một số phương án, chiều dài của thân nằm trong khoảng từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ. Theo một số phương án, chiều dài của thân là 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ ngoài chiều dài của thân, hàm lượng cặp bazơ GC của thân cũng có thể được thay đổi cải biến mức độ ổn định của thân.

Aptame/Phối tử

Thuật ngữ “aptame” được dùng trong bản mô tả này để chỉ polynucleotit ARN (hoặc ADN mã hóa polynucleotit ARN) mà liên kết đặc hiệu với phối tử hoặc với polynucleotit ARN mà được sàng lọc để xác định liên kết đặc hiệu với phối tử (tức là aptame triển vọng). Thư viện aptame là bộ sưu tập gồm các aptame triển vọng chứa nhiều aptame triển vọng có trình tự nucleotit mà khác các thành viên khác của thư viện này ở ít nhất một nucleotit.

Thuật ngữ “phối tử” được dùng để chỉ phân tử mà được liên kết đặc hiệu bởi aptame, hoặc với phối tử về sau mà được sàng lọc theo khả năng trong việc liên kết với một hoặc nhiều aptame. Thư viện phối tử là bộ sưu tập gồm các phối tử và/hoặc các phối tử về sau.

Theo một phương án, phối tử là phân tử có phân tử lượng thấp (thấp hơn khoảng 1.000 dalton) bao gồm, ví dụ, lipid, monosacarit, thể mang thông tin thứ hai, đồng tác nhân, ion kim loại, sản phẩm tự nhiên và chất chuyển hóa khác, axit nucleic, cũng như hầu hết các thuốc điều trị bệnh. Theo một phương án, phối tử là polynucleotit với 2 hoặc nhiều bazơ nucleotit.

Theo một phương án, phối tử được chọn từ nhóm bao gồm 8-azaguanin, adenosin 5'-monophosphat monohydrat, amphoterixin B, avermectin B1, azathioprin, Clomadinon axetat, mercaptopurin, moricizin hydroclorua, N6-metyladenosin, nadide, progesteron, Promazin hydroclorua, pyrvinium pamoat, sulfaguanidin, testosteron propionat, thioguanosin, Tyloxapol và Vorinostat.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp theo sáng chế được dùng để xác định phối tử mà là phân tử nội bào mà liên kết với aptame (tức là phối tử nội sinh) trong catxet polynucleotit, nhờ đó gây ra sự biểu hiện của gen thông báo. Ví dụ, các tế bào với gen thông báo chứa catxet polynucleotit để biểu hiện gián tiếp thông qua aptame/phối tử, có thể được cho tiếp cận với điều kiện, như nhiệt, sinh trưởng, biến nạp, hoặc đột biến, dẫn đến các thay đổi về các phân tử phát tín hiệu của tế bào, các chất chuyển hóa, các

peptit, các lipit, các ion (ví dụ, Ca^{2+}), v.v. mà có thể liên kết với aptame này và gây biểu hiện gen thông báo đó. Do đó, các phương pháp theo sáng chế, có thể được dùng để xác định các aptame mà liên kết với các phối tử nội bào đáp lại các thay đổi về trạng thái của tế bào, bao gồm, ví dụ, thay đổi về sự phát tín hiệu của tế bào, chuyển hóa ở tế bào, hoặc các đột biến bên trong tế bào. Theo một phương án khác, sáng chế được áp dụng để xác định các aptame mà liên kết các phối tử nội bào có mặt ở các tế bào đã được biệt hóa. Ví dụ, các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng để xác định các phối tử hoặc các aptame mà liên kết các phối tử mà có mặt trong các tế bào gốc của tủy đã được cảm ứng. Theo một phương án, các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng để sàng lọc để đáp lại sự biệt hóa tế bào *in vivo*, hoặc các thay đổi sinh lý của các tế bào *in vivo*.

Các phối tử aptame cũng có thể là các thành phần nội sinh của tế bào mà làm tăng ở mức độ đáng kể trong các điều kiện sinh lý/bệnh lý cụ thể, như biến nạp gây ung thư – chúng có thể bao gồm phân tử mang thông tin thứ hai như GTP hoặc GDP, canxi; các axit béo, hoặc các axit béo mà không được chuyển hóa một cách thích hợp như 13-HODE ở ung thư vú (Flaherty, JT et al., Plos One, Vol. 8, e63076, 2013, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); các axit amin hoặc các chất chuyển hóa của axit amin; các chất chuyển hóa trong chu trình thủy phân glucoza mà thông thường có các mức nồng độ cao hơn ở các tế bào ung thư hoặc ở các tế bào bình thường ở các bệnh chuyển hóa; và các phân tử liên quan đến ung thư như Ras hoặc protein Ras đột biến, EGFR đột biến ở ung thư phổi, indolamin-2,3-dioxygenaza (IDO) ở nhiều loại ung thư. Các phối tử nội sinh bao gồm các chất chuyển hóa progesteron ở ung thư vú như đã bộc lộ bởi JP Wiebe (Endocrine-Related ung thư (2006) 13:717–738, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phối tử nội sinh còn bao gồm các chất chuyển hóa với nồng độ cao hơn tạo ra được từ các đột biến ở các enzym chuyển hóa then chốt ở ung thư thận như lactat, glutathion, kynurenin như đã bộc lộ bởi Minton, DR và Nanus, DM (Nature Reviews, Urology, Vol. 12, 2005, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Tính đặc hiệu của liên kết của aptame với phối tử có thể được xác định theo hằng số phân ly tương đối (K_d) của aptame này đối với phối tử của nó so với hằng số phân ly của aptame này đối với các phân tử không liên kết. Do đó, phối tử là phân tử mà liên kết với aptame với ái lực cao hơn nguyên liệu không liên kết. Nói chung, K_d đối với aptame so với phối tử của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 10 lần so với K_d đối với aptame với các phân tử không liên kết. Theo các phương án khác, K_d thấp hơn ít nhất là khoảng 20 lần, thấp hơn ít nhất là khoảng 50 lần, thấp hơn ít nhất là khoảng 100 lần, và thấp hơn ít nhất

là khoảng 200 lần. Aptame sẽ thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 15 đến 200 nucleotit. Thông thường hơn, aptame có chiều dài nằm trong khoảng từ 30 đến 100 nucleotit.

Các aptame mà có thể được kết hợp vào là một phần của công tắc ribo và được sàng lọc theo các phương pháp theo sáng chế có thể là aptame có trong tự nhiên, hoặc các cải biến của nó, hoặc các aptame mà được thiết kế *de novo* hoặc tổng hợp được sàng lọc thông qua sự phát triển toàn thân của các phối tử theo cách làm giàu theo số mũ (SELEX). Các ví dụ về aptame mà liên kết phân tử nhỏ các phối tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, theophyllin, dopamin, sulforodamin B, và xelobioza kanamycin A, lividomycin, tobramycin, neomycin B, viomycin, cloramphenicol, streptomycin, các xytokin, bề mặt tế bào các phân tử, và các chất chuyển hóa. Tổng quan về aptame mà nhận diện các phân tử nhỏ, ví dụ, xem: Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) và McKeague, M. & DeRosa, M.C. *J. Nuc. Aci.* 2012. Theo một phương án khác, aptame là polynucleotit hỗ trợ.

Theo một phương án, aptame được sàng lọc sơ bộ để liên kết với phối tử phân tử nhỏ cụ thể *in vitro*. Các phương pháp thiết kế aptame như vậy bao gồm, ví dụ, SELEX. Các phương pháp thiết kế aptame mà liên kết một cách chọn lọc phân tử nhỏ bằng cách áp dụng SELEX được bộc lộ, ví dụ, trong các patent Mỹ số 5,475,096, 5,270,163, và Abdullah Ozer, et al. *Nuc. Aci.* 2014, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các cải biến của quy trình SELEX được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,580,737 và 5,567,588, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kỹ thuật chọn lọc trước đây để xác định các aptame thường bao gồm việc chuẩn bị vốn lớn gồm các phân tử ADN hoặc ARN có chiều dài mong muốn mà chứa vùng mà được ngẫu nhiên hóa hoặc được gây đột biến. Ví dụ, vốn oligonucleotit nhằm lựa chọn aptame có thể chứa vùng gồm 20 đến 100 nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa được bọc sườn bởi các vùng có trình tự xác định mà dài khoảng 15 đến 25 nucleotit và hữu ích để liên kết các đoạn mồi PCR. Vốn oligonucleotit được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật PCR chuẩn, hoặc các cách khác mà cho phép khuếch đại các trình tự axit nucleic đã chọn. ADN vốn có thể được phiên mã *in vitro* để tạo ra vốn bản sao của ARN khi aptame ARN được mong đợi. Tiếp đó, vốn của các oligonucleotit ARN hoặc ADN được đưa đến bước chọn lọc trên cơ sở khả năng của chúng trong việc liên kết đặc hiệu với phối tử mong muốn. Các kỹ thuật chọn lọc bao gồm, ví dụ, sắc ký theo ái lực, mặc dù quy trình bất kỳ mà cho phép chọn lọc các axit nucleic trên cơ sở khả năng của

chúng liên kết đặc hiệu với phân tử khác đều có thể được áp dụng. Các kỹ thuật chọn lọc để xác định các aptame mà liên kết các phân tử nhỏ và có chức năng trong tế bào có thể bao gồm các phương pháp sàng lọc trên cơ sở tế bào. Trong trường hợp sắc ký theo ái lực, các oligonucleotit được cho tiếp xúc với phối tử đích mà đã được cố định trên nền trong cột hoặc trên các hạt từ tính. Tốt hơn, nếu oligonucleotit được chọn cho liên kết phối tử với sự có mặt của nồng độ muối, nhiệt độ, và các điều kiện khác mà bắt chước các điều kiện sinh lý thông thường. Các oligonucleotit thuộc vốn mà liên kết với phối tử được giữ lại trên cột hoặc hạt, và các trình tự không liên kết được rửa bỏ. Tiếp đó, các oligonucleotit mà liên kết phối tử được khuếch đại (sau khi phiên mã ngược nếu bản sao của ARN được sử dụng) theo phương pháp PCR (thường là sau khi rửa giải). Quá trình chọn lọc được lặp lại trên các trình tự chọn lọc trong tổng cộng khoảng ba đến mười vòng lặp lại quy trình chọn lọc. Tiếp đó, các oligonucleotit thu được được khuếch đại, được tách dòng, và được giải trình tự bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn để xác định các trình tự của các oligonucleotit mà có khả năng liên kết đích phối tử. Sau khi trình tự aptame đã được xác định, aptame có thể được tối ưu hóa hơn nữa bằng cách thực hiện các vòng chọn lọc bổ sung bắt đầu từ vốn oligonucleotit chứa trình tự aptame đã được gây đột biến.

Theo một phương án, aptame hoặc thư viện aptame để dùng theo sáng chế chứa một hoặc nhiều aptame xác định được ở sàng lọc aptame *in vitro*. Theo một phương án, các aptame xác định được ở sàng lọc aptame *in vitro* có một hoặc nhiều nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa để tạo ra thư viện aptame về sau để dùng trong các phương pháp theo sáng chế.

Exon khác

Exon khác mà là một phần của catxet polynucleotit điều hòa của gen theo sáng chế có thể là trình tự polynucleotit bất kỳ có khả năng được phiên mã thành tiền-ARN thông tin và ghép nối theo cách khác vào ARN thông tin của gen đích đó. Exon khác mà là một phần của catxet điều hòa gen theo sáng chế chứa ít nhất một trình tự mà ức chế sự dịch mã sao cho khi exon khác này được đưa vào ARN thông tin của gen đích, thì sự biểu hiện của gen đích từ ARN thông tin đó bị ngăn chặn hoặc giảm. Theo một phương án được ưu tiên, exon khác này chứa codon dừng (TGA, TAA, TAG) mà là trong khung với gen đích khi exon khác này được đưa vào gen đích ARN thông tin bằng cách ghép nối. Theo các phương án, exon khác này chứa, ngoài codon dừng, hoặc là phương án thay thế cho codon dừng, trình tự khác mà làm giảm hoặc hầu như ngăn cản sự dịch mã khi exon

khác này được đưa bằng cách ghép nối vào ARN thông tin của gen đích bao gồm, ví dụ, vị trí liên kết ARN cỡ micron, mà dẫn đến sự thoái biến của ARN thông tin. Theo một phương án, exon khác này chứa trình tự liên kết ARN cỡ micro mà gây ra sự thoái biến của ARN thông tin. Theo một phương án, exon khác này mã hóa trình tự polypeptit mà làm giảm mức độ ổn định của protein chứa trình tự polypeptit này. Theo một phương án, exon khác này mã hóa trình tự polypeptit mà chỉ phối protein chứa trình tự polypeptit này trong quá trình thoái biến.

Mức độ ghép nối gốc hoặc mức độ ghép nối nền của exon khác này có thể được tối ưu hóa bằng cách làm thay đổi các trình tự của gen tăng cường ghép nối exon (ESE) và các trình tự của gen ức chế ghép nối exon (ESS) và/hoặc bằng cách đưa các trình tự ESE hoặc ESS vào exon khác này. Các thay đổi như vậy đối với trình tự của exon khác này có thể được hoàn thành bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gây đột biến định hướng điểm. Theo cách khác, các oligonucleotit của trình tự mong muốn (ví dụ, chứa toàn bộ hoặc một phần của exon khác này) có thể thu được từ các nguồn thương mại và được tách dòng vào catxet điều hòa gen. Việc xác định các trình tự ESS và ESE có thể được hoàn thành theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, bằng cách sử dụng ESEfinder 3.0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: tài nguyên mạng để xác định các gen tăng cường ghép nối exon. *Nucleic Acid Research*, 2003, 31(13): 3568-3571) và/hoặc các tài nguyên sẵn có khác.

Theo một phương án, exon khác này là ngoại sinh đối với gen đích, mặc dù nó có thể thu được từ trình tự có nguồn gốc từ sinh vật nơi mà gen đích sẽ được biểu hiện. Theo một phương án, exon khác này là trình tự tổng hợp. Theo một phương án, exon khác này là exon có trong tự nhiên. Theo một phương án khác, exon khác này thu được từ toàn bộ hoặc một phần của exon đã biết. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thu được” được dùng để chỉ exon khác chứa trình tự mà hầu như tương đồng với exon có trong tự nhiên, hoặc phần của nó, nhưng có thể chứa các đột biến khác nhau, ví dụ, để đưa vào codon dừng mà nó sẽ ở trong cùng khung với trình tự của gen thông báo đích, hoặc để đưa vào hoặc xóa bỏ gen tăng cường ghép nối exon, và/hoặc đưa vào hoặc xóa bỏ gen ức chế ghép nối exon. Theo một phương án, exon khác này thu được từ exon 2 của gen dihydrofolat reductaza (DHFR) của người, exon 5 đột biến của khối u Wilms 1 của người, exon 16 của protein kinaza II delta phụ thuộc canxi/calmodulin của chuột, hoặc SIRT1 exon 6.

Các trình tự của intron 5' và 3'

Exon khác này được bọc sườn bởi các trình tự của intron 5' và 3'. Các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' mà có thể được dùng trong catxet điều hòa gen có thể là trình tự bất kỳ mà có thể được ghép nối ngoài gen đích đó tạo ra ARN thông tin của gen đích hoặc gen đích chứa exon khác này trong ARN thông tin, tùy theo sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết với aptame. Mỗi intron trong số các intron ở đầu tận cùng 5' và 3' có trình tự cần thiết để xảy ra sự ghép nối, tức là thể cho ghép nối, thể nhận ghép nối và trình tự điểm nhánh. Theo một phương án, các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' của catxet điều hòa gen thu được từ một hoặc nhiều intron có trong tự nhiên hoặc phần của chúng. Theo một phương án, các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' thu được từ beta-globin intron 2 của người bị cắt cụt (IVS2 Δ). Theo các phương án khác, các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' thu được từ intron của ARN thông tin của SV40 (được dùng ở vật truyền pCMV-LacZ từ Clontech), intron 6 của gen trioza phosphat isomeraza (TPI) của người (Nott Ajit, et al. *RNA*. 2003, 9:6070617), hoặc intron từ yếu tố IX của người (Sumiko Kurachi et al. *J. Bio. Chem.* 1995, 270(10), 5276), intron nội sinh của chính gen đích, hoặc đoạn bất kỳ của hệ gen hoặc các intron tổng hợp (Yi Lai, et al. *Hum Gene Ther.* 2006:17(10):1036) mà chứa các yếu tố mà là đủ cho sự ghép nối điều hòa (Thomas A. Cooper, *Methods* 2005 (37):331).

Theo một phương án, exon khác này và công tắc ribo theo sáng chế được xử lý để ở trong intron nội sinh của gen đích. Tức là intron (hoặc trình tự intron về cơ bản là tương tự) có trong tự nhiên tại vị trí đó của gen đích. Trong trường hợp này, trình tự của intron ngay lập tức trước exon khác này được gọi là intron ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự intron ở đầu tận cùng 5', và trình tự của intron ngay lập tức sau exon khác này được gọi là intron ở đầu tận cùng 3' hoặc trình tự intron ở đầu tận cùng 3'. Trong trường hợp này, intron nội sinh được cải biến để chứa trình tự thể nhận ghép nối và trình tự thể cho ghép nối bọc sườn các đầu tận cùng 5' và 3' của exon khác này.

Các vị trí của thể cho ghép nối và thể nhận ghép nối ở catxet điều hòa gen theo sáng chế có thể được cải biến để được củng cố mạnh hơn hoặc bị làm yếu đi. Tức là, các vị trí ghép nối có thể được cải biến để gần hơn tới vị trí liên ứng đối với thể cho ghép nối hoặc thể nhận ghép nối theo các phương pháp tách dòng chuẩn, đột biến định hướng điểm, và các cách tương tự. Các vị trí ghép nối mà là tương tự hơn đối với liên ứng ghép nối có xu hướng thúc đẩy ghép nối và nhờ đó được củng cố mạnh hơn. Các vị trí ghép nối mà kém tương tự với liên ứng ghép nối có xu hướng cản trở ghép nối và do đó bị làm yếu đi. Sự liên ứng đối với thể cho ghép nối của nhóm intron phổ biến nhất (U2) là A/C A G ||

G T A/G A G T (trong đó || biểu thị ranh giới exon/intron). Liên ứng đối với thể nhận ghép nối là C A G || G (trong đó || biểu thị ranh giới exon/intron). Tần suất của nucleotit cụ thể tại các vị trí của thể cho và thể nhận ghép nối được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Zhang, M.Q., *Hum Mol Genet.* 1988. 7(5):919-932). Mức bền của các vị trí ghép nối 5' và 3' có thể được điều chỉnh để điều biến sự ghép nối exon khác nhau.

Các cải biến bổ sung đối với các intron ở đầu tận cùng 5' và 3' trong catxet điều hòa gen có thể được tạo ra để điều biến sự ghép nối bao gồm cải biến, xóa bỏ, và/hoặc bổ sung các yếu tố tăng cường ghép nối intron và/hoặc các yếu tố ức chế ghép nối intron, và/hoặc cải biến trình tự vị trí nhánh.

Theo một phương án, intron ở đầu tận cùng 5' được cải biến để chứa codon dừng mà nó sẽ ở trong cùng một khung với gen thông báo. Các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' cũng có thể được cải biến để loại bỏ các vị trí ghép nối khó hiểu, mà có thể được xác định nhờ phần mềm sẵn có công khai (ví dụ, xem tài liệu: Kapustin, Y. et al. *Nucl. Acids Res.* 2011. 1-8). Chiều dài của các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' có thể được điều chỉnh để, ví dụ, đáp ứng các yêu cầu về mặt kích thước đối với các cấu trúc biểu hiện virus. Theo một phương án, các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' độc lập có chiều dài nằm trong khoảng từ 50 nucleotit đến 300 nucleotit. Theo một phương án, các trình tự intron ở đầu tận cùng 5' và 3' độc lập có chiều dài nằm trong khoảng từ 125 nucleotit đến 240 nucleotit.

Gen thông báo

Các phương pháp sàng lọc theo sáng chế sử dụng catxet điều hòa gen mà được dùng để điều hòa sự biểu hiện của gen đích (ví dụ, gen thông báo) mà có thể được biểu hiện ở tế bào đích, mô hoặc sinh vật. Gen thông báo có thể là gen bất kỳ mà sự biểu hiện của nó có thể được dùng để phát hiện tương tác đặc hiệu của phối tử với aptame trong catxet điều hòa gen. Theo một phương án, gen thông báo mã hóa protein huỳnh quang, bao gồm, ví dụ, protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP), protein huỳnh quang màu xanh lục, protein huỳnh quang màu vàng, protein huỳnh quang màu cam, protein huỳnh quang màu đỏ, hoặc protein huỳnh quang dễ chuyển đổi. Theo một phương án khác, gen thông báo mã hóa luxiferaza enzym bao gồm, ví dụ, của luxiferaza của con đom đóm, luxiferaza Renilla, hoặc luxiferaza Gaussia tiết. Theo một phương án, gen thông báo là β -galactosidaza. Theo một phương án, gen thông báo là peroxidaza của cây củ cải cay

(HRP). Theo một phương án, gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm protein của nhân, protein vận chuyển, protein của màng tế bào, protein của khung tế bào, thụ thể, hormon sinh trưởng, xytokin, phân tử phát tín hiệu, ARN điều hòa, kháng thể, và các protein hoặc các peptit dùng để điều trị bệnh.

Cấu trúc biểu hiện

Sáng chế dự tính sử dụng vật truyền tái tổ hợp để đưa vào các tế bào polynucleotit đích mã hóa gen thông báo và chứa catxet điều hòa gen theo sáng chế. Theo nhiều phương án, cấu trúc ADN tái tổ hợp của sáng chế bao gồm các yếu tố ADN bổ sung kể cả các phân đoạn ADN mà chuẩn bị cho việc sao chép ADN trong tế bào chủ và sự biểu hiện của gen đích trong tế bào đó ở mức độ thích hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng các trình tự giám sát biểu hiện (các gen khởi đầu, các gen tăng cường, và các gen tương tự) được chọn dựa trên khả năng của chúng trong việc thúc đẩy sự biểu hiện của gen thông báo ở tế bào đích. Thuật ngữ “vật truyền” có nghĩa là plasmid tái tổ hợp, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome - YAC), nhiễm sắc thể mini, vòng mini của ADN hoặc virus (kể cả các trình tự có nguồn gốc từ virus) mà chứa polynucleotit cần được phân phối vào tế bào chủ, dù là *in vitro* hay *in vivo*. Theo một phương án, vật truyền tái tổ hợp là vật truyền virus hoặc kết hợp nhiều vật truyền virus. Các vật truyền virus để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua aptame ở tế bào đích là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm vật truyền adenovirus (AV), vật truyền virus adeno liên hợp (AAV), vật truyền retrovirus và lentivirus, và vật truyền bệnh mụn rộp do virus herpes typ 1 (HSV1).

Phương pháp chia thư viện aptame thành các thư viện phụ

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các phương pháp chia các thư viện oligonucleotit lớn thành các thư viện phụ nhỏ hơn và các cách thức để tạo ra các thư viện plasmid dễ sàng lọc được theo thử nghiệm tế bào của các công tắc ribo tổng hợp dựa trên aptame. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tách thư viện oligonucleotit thành các thư viện phụ nhỏ hơn bao gồm các bước:

- (a) chuẩn bị thư viện oligonucleotit, trong đó các oligonucleotit trong thư viện này bao gồm nhiều vùng ổn định 5' và 3',
- (b) thực hiện PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng thư viện oligonucleotit làm khuôn và các đoạn mỗi thứ nhất và các đoạn mỗi thứ hai mà là hỗ trợ cho các vùng ổn định 5' và 3',

(c) phân lập các sản phẩm của PCR hai chu kỳ, và

(d) khuếch đại theo phương pháp PCR phân nhóm bao gồm các sản phẩm đã được phân lập của PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng các đoạn mồi hỗ trợ cho phân nhóm bao gồm các vùng ổn định duy nhất ở đầu tận cùng 5' và 3'.

Theo một phương án, thư viện oligonucleotit là thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa chứa một hoặc nhiều nucleotit ngẫu nhiên. Các trình tự aptame được bọc sườn bởi vùng ổn định trái và phải, mà chứa vị trí cắt giới hạn để tách dòng tiếp.

Theo một phương án, đoạn mồi thứ nhất hoặc thứ hai trong PCR hai chu kỳ chứa nhãn được chọn từ nhóm bao gồm biotin, digoxigenin (DIG), bromodeoxyuridin (BrdU), nhóm huỳnh quang, nhóm hóa học, ví dụ nhóm thiol, hoặc nhóm hóa học ví dụ azit được dùng trong Click Chemistry. Các phân tử này có thể được liên kết với các oligonucleotit, và interacting các phân tử tương tác của chúng, như streptavidin hoặc các dạng đã được cải biến của avidin đối với biotin, các kháng thể kháng DIG hoặc BrdU hoặc nhóm huỳnh quang, hoặc nhóm thiol thứ hai để tạo ra disulfua, alkyn nhóm cho các azit, có thể được cố định trên bề mặt rắn để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân lập các oligonucleotit đã được đánh dấu.

Sau khi thư viện aptame được chia thành các thư viện phụ aptame, các aptame ở một hoặc nhiều thư viện phụ được đưa vào catxet polynucleotit điều hòa của gen để tạo ra thư viện công tắc ribo và được sàng lọc để liên kết phối tử theo các phương pháp theo sáng chế.

Phương pháp chia các thư viện công tắc ribo thành các thư viện phụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chia thư viện công tắc ribo thành các thư viện phụ. Thuật ngữ thư viện công tắc ribo được dùng trong bản mô tả này là thư viện plasmid chứa catxet polynucleotit điều hòa của gen, ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này và trong đơn PCT/US2016/016234, chứa nhiều aptame khi từng thành viên của thư viện này bao gồm các trình tự aptame mà là khác các thành viên khác của thư viện. Theo các phương án, các aptame trong thư viện công tắc ribo bao gồm một hoặc nhiều nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa. Theo các phương án, plasmid thư viện công tắc ribo được tạo ra từ thư viện phụ aptame tạo ra được theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Phương pháp chia thư viện công tắc ribo thành các thư viện phụ bao gồm các bước:

- (a) đưa thư viện aptame vào plasmit chứa catxet polynucleotit điều hòa của gen được bộc lộ trong bản mô tả này để tạo ra thư viện công tắc ribo;
- (b) đưa thư viện công tắc ribo vào vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*);
- (c) gom các dòng vi khuẩn (ví dụ, bằng cách nhặt các khuẩn lạc của vi khuẩn) và chiết ADN của plasmit để thu được thư viện phụ công tắc ribo của plasmit (trong bản mô tả này còn được gọi là thư viện phụ sơ khai);
- (d) một cách tùy ý, tạo ra thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp từ thư viện phụ sơ khai gồm các công tắc ribo của plasmit bằng cách đưa thư viện phụ sơ khai vào vi khuẩn, gom các dòng vi khuẩn và phân lập ADN của plasmit.

Phương pháp đưa các trình tự vào các plasmit để tạo ra thư viện là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như là các phương pháp đưa plasmit vào vi khuẩn và thu nhận các dòng vi khuẩn. Các dòng vi khuẩn chứa một thành viên của plasmit thư viện công tắc ribo có thể được gom bằng cách cấy vi khuẩn lên đĩa và nhặt từng khuẩn lạc riêng rẽ. Các plasmit gom được từ các dòng này tạo nên thư viện phụ. Số lượng dòng vi khuẩn gom được xác định kích thước (số lượng thành viên duy nhất) của thư viện phụ công tắc ribo và nhiều thư viện phụ có thể được tạo ra. Một hoặc nhiều thư viện phụ sơ khai có thể chia tiếp để tạo ra thư viện phụ thứ cấp để giảm tiếp kích thước của thư viện phụ. Các thư viện phụ được sàng lọc bằng cách áp dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này bằng cách đưa một hoặc nhiều thư viện phụ vào các tế bào nhân chuẩn, cho các tế bào này tiếp cận với phối tử đáng quan tâm, và đo mức độ biểu hiện của gen thông báo từ catxet polynucleotit điều hòa của gen. Mức gia tăng về mức độ biểu hiện của gen thông báo đáp lại phối tử cho thấy rằng một hoặc nhiều thành viên của thư viện này chứa aptame mà liên kết với phối tử trong phạm vi công tắc ribo. Do đó, kích thước của thư viện phụ mà có thể được sàng lọc có thể được xác định theo độ nhạy của thử nghiệm này để đo mức độ biểu hiện gen thông báo. Theo các phương án của sáng chế, thư viện phụ chứa khoảng 50 đến 600 thành viên duy nhất (mặc dù một số thành viên có thể được lặp lại trong thư viện phụ khác).

Cần phải hiểu và mong đợi rằng sự dao động về nguyên lý của sáng chế đã bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và dự định rằng các cải biến này được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu tham khảo nêu trong bản mô tả này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách

viện dẫn. Các ví dụ dưới đây minh họa tiếp sáng chế, nhưng không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Sàng lọc aptame/phối tử trên cơ sở tế bào của động vật có vú bằng cách sử dụng các công tắc ribo điều hòa gen dựa trên việc ghép nối.

Các quy trình:

Dựng công tắc ribo: các công tắc ribo được dựng như được bộc lộ trong PCT/US2016/016234 (ở các ví dụ cụ thể 3 đến 6), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trình tự beta-globin intron đã bị cắt đứt của người được tổng hợp và được cài xen vào trình tự mã hóa gen luxiferaza của con đom đóm. Exon 2 DHFR đột biến của người được tổng hợp và được cài xen vào giữa của trình tự beta-globin intron đã bị cắt đứt bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng cổng Vàng. Các aptame bao gồm xpt-G/A¹, ydhl-G/A², yxj³, add⁴, gdg6-G/A⁵ (viện dẫn về các aptame được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) được tổng hợp ở dạng các oligonucleotit (“các oligo”) với 4 nucleotit treo ở đầu tận cùng 5' mà là hỗ trợ cho hai vị trí BsaI này riêng lẻ (IDT), được ghép đôi và đã được buộc vào vật truyền thể nhận mDHFR-Luci bị tiêu bởi BsaI.

Chuyển nhiễm: 3,5 x10⁴ tế bào HEK 293 được cấy vào đĩa đáy phẳng loại 96 lỗ vào ngày trước khi chuyển nhiễm. ADN plasmit (500ng) được bổ sung vào ống hoặc đĩa đáy chữ U loại 96 lỗ. Một cách riêng rẽ, chất phản ứng TransIT-293 (Mirus; 1,4μl) được bổ sung vào 50μl môi trường Opti-mem I (do Life Technologies cung cấp), và được để yên trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT). Sau đó, 50μl chất phản ứng chuyển nhiễm đã pha loãng được bổ sung vào ADN, được trộn, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Cuối cùng, 7μl dung dịch này được bổ sung vào lỗ tế bào trong đĩa loại 96 lỗ.

Thử nghiệm về luxiferaza của con đom đóm ở các tế bào đã được nuôi cấy: 24 giờ sau khi thay đổi môi trường, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, và được làm cân bằng đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian vài phút trên bàn thí nghiệm, sau đó được hút. Dung dịch đệm tiêu glo (do Promega cung cấp, 100μl, ở nhiệt độ trong phòng) được bổ sung vào, và các đĩa này được duy trì ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất 5 phút. Sau đó, dung lượng của lỗ được trộn bằng cách nghiền tán nhỏ 50μl, và 20μl từng mẫu được

trộn với 20 μ l chất phản ứng glo nhẹ (do Promega cung cấp) mà đã được pha loãng đến 10% trong dung dịch đệm tiêu glo. 96 lỗ được để cách nhau trên đĩa trắng đục loại 384 lỗ. Sau 5 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, mức độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy Tecan với thời gian đọc 500 phần nghìn giây. Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện theo đơn vị sáng tương đối trung bình (RLU) $\pm$ sai số chuẩn (S.D.), và số lần tăng được tính theo hoạt tính của luxiferaza thu được nhờ xử lý bằng guanin chia cho hoạt tính của luxiferaza thu được không xử lý bằng guanin.

Kết quả:

Bắt đầu với luxiferaza làm gen thông báo, nền tảng biểu hiện gen được tạo ra bằng cách cài xen β -globin intron của người ở giữa của trình tự mã hóa của luxiferaza của con đom đóm và DHFR exon 2 của người chứa codon dừng đột biến ở phần intron. Nhờ vậy, mức độ biểu hiện của gen thông báo được kiểm soát bằng cách đưa vào hoặc loại bỏ mDHFR exon chứa codon dừng mà là trong cùng khung với gen thông báo. Trong hệ thống này, cấu trúc kẹp tóc ở ARN thông tin tạo được bởi vị trí liên kết U1 và trình tự bổ trợ đã được cài xen vào phong bế việc đưa mDHFR exon vào, do đó cho phép biểu hiện gen đích (hình 1a). Để khiến cho việc hình thành cấu trúc kẹp tóc có thể điều hòa được, và bằng cách đó khiến sự biểu hiện gen đích có thể kiểm soát được bởi các phân tử nhỏ, các tác giả sáng chế đã ghép các aptame tổng hợp (theophylin) hoặc các aptame tự nhiên (các aptame xpt-G/A, yxj, ydhl-A/G, add-A/G) hoặc aptame lai gdg6-G/A) vào nền tảng điều hòa gen trên cơ sở ghép nối này ở giữa vị trí liên kết U1 và trình tự bổ trợ của nó, và công tắc ribo tổng hợp đã được tạo ra mà điều hòa mức độ biểu hiện gen ở các tế bào của động vật có vú. Bằng cách sử dụng catxet điều hòa gen trên cơ sở ghép nối của các tác giả sáng chế và cài xen các aptame khác nhau vào cấu trúc công tắc ribo tổng hợp của các tác giả sáng chế, các tác giả này đã cho thấy các đáp ứng chức năng khác nhau đối với phối tử ở các tế bào của động vật có vú. Công tắc ribo có aptame guanin đáp ứng với guanin cũng như guanosin như được thể hiện trên hình 1b. Công tắc ribo xpt-guanin, là xpt-G17 (đã bộc lộ trong đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2016/016234, ví dụ, xem: SEQ ID NO:15, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), tạo ra khoảng động lực học cao cảm ứng sự biểu hiện của gen thông báo đáp lại phối tử nhờ xử lý bằng phối tử tự nhiên của nó.

Mặc dù các công tắc ribo trên cơ sở aptame tự nhiên có khoảng động lực học cao trong việc điều hòa sự biểu hiện gen ở các tế bào của động vật có vú, bản chất của các phối tử đối với các aptame tự nhiên giới hạn khả năng ứng dụng của chúng *in vivo*. Dựa vào ưu điểm của nền tảng điều hòa gen động lực học cao của các tác giả sáng chế với các

công tắc ribo, trước tiên các tác giả sàng chế chọn danh mục gồm các chất tương tự guanin mà có các nhóm hóa học khác nhau tại vị trí N2 để thử nghiệm các hoạt tính của chúng trên công tắc ribo xpt-G17. Như được thể hiện trên hình 1c, ở nồng độ 500 μ M, vài hợp chất N2 cảm ứng hoạt tính của luxiferaza ở các tế bào có cấu trúc xpt-G17, trong đó N2-Phenoxyaxetyl guanin có hiệu lực cao nhất (gây tăng gấp 1303 lần) như được thể hiện trên hình 1d. Để mở rộng danh mục hợp chất để dùng làm các phối tử tiềm năng, thư viện Prestwick (bộ sưu tập gồm 1280 thuốc đã được cấp phép sử dụng trong lâm sàng) được sử dụng ở nồng độ 100 μ M để sàng lọc các phối tử tối ưu để hoạt hóa các aptame đã biết ở các tế bào của động vật có vú. Như được thể hiện trên hình 1e từ sàng lọc sơ bộ, công tắc ribo guanin xpt-G17 không chỉ đáp ứng với guanin, mà còn đáp ứng với cả 8-azaguanin, Nadide, N6-metyladenosin, testosterone propionat, adenosin 5'-monophosphat monohydrat, amphoterixin B, thioguanin, tyloxapol, progesteron và clomadinon axetat như được thể hiện trên hình 1e, cũng như nhiều hợp chất khác như liệt kê trong Bảng 1. Một cách đáng ngạc nhiên, một vài hợp chất trong số các hợp chất mà thể hiện hoạt tính đối với công tắc ribo xpt-G17 là rất khác về mặt cấu trúc so với guanin hoặc guanosin. Thư viện Prestwick được sàng lọc tiếp với công tắc ribo purin khác, và thu được nhiều hợp chất mà có thể hoạt hóa công tắc ribo trong việc cảm ứng hoạt tính của luxiferaza (Bảng 1). Các kết quả này thể hiện ứng dụng quan trọng của hệ công tắc ribo trong việc phát hiện các phối tử tiềm năng tối ưu đối với aptame đã biết trong môi trường tế bào, nhấn mạnh hơn nữa tầm quan trọng của việc tạo ra các aptame ở tế bào nơi mà công tắc ribo là cần thiết để thực hiện chức năng.

Bảng 1.

Công tắc ribo	Tên hợp chất	Số lần gia tăng
xpt-G17	8-Azaguanin	131,0
xpt-G17	Azathioprin	6,2
xpt-G17	Xinnarizin	3,5
xpt-G17	Pimethixen maleat	4,7
xpt-G17	N6-metyladenosin	30,7
xpt-G17	thioguanosin	21,0
xpt-G17	Adenosin 5'-monophosphat monohydrat	28,4
xpt-G17	Amphoterixin B	21,5
xpt-G17	Testosteron propionat	29,0
xpt-G17	Haloprogin	5,1
xpt-G17	Idebenon	3,3
xpt-G17	Zotepin	4,3
xpt-G17	Progesteron	12,0
xpt-G17	Tenatoprazol	3,2

Công tác ribo	Tên hợp chất	Số lần gia tăng
xpt-G17	Muối axetopromazin maleat	4,5
xpt-G17	Etofenamát	7,5
xpt-G17	Mercaptopurin	3,6
xpt-G17	Avermectin B1	4,0
xpt-G17	Promazin hydroclorua	3,7
xpt-G17	Nadide	40,9
xpt-G17	Trimeprazin tartrat	4,9
xpt-G17	Promethazin hydroclorua	5,3
xpt-G17	Tyloxapol	16,2
xpt-G17	Clomadinon axetat	10,3
xpt-G17	Pyrvinium pamoat	5,1
gdg6-A8	8-Azaguanin	305,9
gdg6-A8	Ximetidin	3,0
gdg6-A8	Azathioprin	19,9
gdg6-A8	Diperođon hydroclorua	3,0
gdg6-A8	Pimethixen maleat	9,2
gdg6-A8	thioguanosin	20,1
gdg6-A8	Muối axetopromazin maleat	8,6
gdg6-A8	Mercaptopurin	17,2
gdg6-A8	Opipramol dihydroclorua	3,1
gdg6-A8	Promazin hydroclorua	12,6
gdg6-A8	Muối methotrimprazin maleat	5,0
gdg6-A8	Đienestrol	4,3
gdg6-A8	Muối trimipramin maleat	5,3
gdg6-A8	Trimeprazin tartrat	8,7
gdg6-A8	Promethazin hydroclorua	4,8
gdg6-A8	Vorinostat	6,4
gdg6-A8	Methiazol	3,8
yxj-A6	8-Azaguanin	55,6
yxj-A6	Azathioprin	6,6
yxj-A6	Pimethixen maleat	4,9
yxj-A6	thioguanosin	10,2
yxj-A6	Muối axetopromazin maleat	3,1
yxj-A6	Mercaptopurin	10,0
yxj-A6	Promazin hydroclorua	6,6
yxj-A6	Sulfaquinoxalin natri	3,4
yxj-A6	Muối trimipramin maleat	3,3
yxj-A6	Trimeprazin tartrat	7,0
yxj-A6	Promethazin hydroclorua	7,9
yxj-A6	Pirlindol mesylat	3,2
add-A6	8-Azaguanin	22,1
add-A6	Azathioprin	6,5
add-A6	Pimethixen maleat	4,2

Công tắc ribo	Tên hợp chất	Số lần gia tăng
add-A6	thioguanosin	5,9
add-A6	Muối axetopromazin maleat	3,5
add-A6	Mercaptopurin	15,0
add-A6	Opipramol dihydroclorua	4,3
add-A6	Promazin hydroclorua	10,5
add-A6	Sulfaquinoxalin natri	3,3
add-A6	Terazosin hydroclorua	3,5
add-A6	Muối trimipramin maleat	3,4
add-A6	Trimeprazin tartrat	4,0
add-A6	Promethazin hydroclorua	4,5
add-A6	Deptropin xitrat	3,3
add-A6	Alcuroni clorua	4,2
ydhl-A6	Hydroclothiazit	3,3
ydhl-A6	8-Azaguanin	3,7
ydhl-A6	Ticlopidin hydroclorua	3,1
ydhl-A6	Muối alverin xitrat	4,2
ydhl-A6	Vincamin	3,3
ydhl-A6	Idebenon	3,5
ydhl-A6	Pepstatin A	4,0
ydhl-A6	Modafinil	3,8
ydhl-A6	Benperidol	3,1
ydhl-A6	Digoxigenin	4,5
ydhl-A6	Digoxigenin	3,3
ydhl-A6	Moricizin hydroclorua	10,3
ydhl-A6	Pivmecillinam hydroclorua	3,2
ydhl-A6	Piperidolat hydroclorua	3,4
ydhl-A6	Oxaprozin	3,4
ydhl-A6	Imidure	4,3
ydhl-A6	Mecamylamin hydroclorua	3,2
xpt-A8	8-Azaguanin	95,1
xpt-A8	Azathioprin	5,9
xpt-A8	Pimethixen maleat	3,3
xpt-A8	thioguanosin	11,8
xpt-A8	Mercaptopurin	3,4
xpt-A8	Promazin hydroclorua	4,1
xpt-A8	Promethazin hydroclorua	5,4
gdg6-G8	8-Azaguanin	42,3
gdg6-G8	Azathioprin	16,2
gdg6-G8	Pimethixen maleat	5,1
gdg6-G8	thioguanosin	15,9
gdg6-G8	Amphotericin B	3,8
gdg6-G8	Muối axetopromazin maleat	3,2
gdg6-G8	Mercaptopurin	16,2

Công tắc ribo	Tên hợp chất	Số lần gia tăng
gdg6-G8	Promazin hydroclorua	6,2
gdg6-G8	Muối trimipramin maleat	3,3
gdg6-G8	Trimeprazin tartrat	6,2
gdg6-G8	Promethazin hydroclorua	6,5
gdg6-G8	Penbutolol sulfat	3,3
gdg6-G8	Vorinostat	10,2
gdg6-G8	Methiazol	3,3
gdg6-G8	Estriol	4,3
add-G6	8-Azaguanin	47,9
add-G6	Niclosamit	3,0
add-G6	Azathioprin	11,4
add-G6	Lynestrenol	3,8
add-G6	R(-)Apomorphin hydroclorua hemihydrat	3,4
add-G6	Danazol	3,7
add-G6	Camptothecin (S, +)	5,7
add-G6	Xinnarizin	3,6
add-G6	Pimethixen maleat	6,6
add-G6	Flunarizin dihydroclorua	4,7
add-G6	N6-metyladenosin	20,8
add-G6	thioguanosin	7,9
add-G6	Adenosin 5'-monophosphat monohydrat	9,4
add-G6	Bepidil hydroclorua	4,4
add-G6	Amphotericin B	10,7
add-G6	Testosteron propionat	8,8
add-G6	Haloprogin	5,9
add-G6	Idebenon	6,7
add-G6	Mecloxyclin sulfosalixylat	3,4
add-G6	Progesteron	6,0
add-G6	Muối axetopromazin maleat	5,0
add-G6	Etofenamat	5,1
add-G6	Mercaptopurin	14,3
add-G6	Benzamil hydroclorua	3,0
add-G6	Avermectin B1	11,8
add-G6	Promazin hydroclorua	5,4
add-G6	Nadide	30,8
add-G6	Muối trimipramin maleat	3,4
add-G6	Trimeprazin tartrat	6,2
add-G6	Simvastatin	6,2
add-G6	Promethazin hydroclorua	6,7
add-G6	Protriptylin hydroclorua	5,0
add-G6	Clomadinon axetat	26,1
add-G6	Nomegestrol axetat	3,5
add-G6	Pyrvinium pamoat	15,8

Công tắc ribo	Tên hợp chất	Số lần gia tăng
add-G6	Sertaconazol Nitrat	6,5
add-G6	Vorinostat	3,6
ydhl-G8	Sulfaguanidin	13,9
ydhl-G8	8-Azaguanin	35,6
ydhl-G8	N6-metyladenosin	10,7
ydhl-G8	thioguanosin	7,5
ydhl-G8	Adenosin 5'-monophosphat monohydrat	5,9
ydhl-G8	Amphotericin B	6,5
ydhl-G8	Tetracyclin hydrochlorua	3,6
ydhl-G8	Muối axetopromazin maleat	3,9
ydhl-G8	Azelastin hydrochlorua	3,0
ydhl-G8	Etofenamat	4,8
ydhl-G8	Mercaptopurin	3,6
ydhl-G8	Promazin hydrochlorua	5,2
ydhl-G8	Nadide	11,7
ydhl-G8	Trimoprazin tartrat	5,0
ydhl-G8	Clomadinon axetat	10,4
ydhl-G8	Pyrvinium pamoat	5,5
ydhl-G8	Vorinostat	3,0

Các trình tự đối với các công tắc ribo được dùng trong sàng lọc thư viện Prestwick được nêu dưới đây với các trình tự thân bằng chữ in hoa, và các trình tự aptame bằng chữ in thường:

xpt-A8 (SEQ ID NO: 1):

GTAATGTataatcgctggatattggcagcaagttctaccgggcaccgtaaatgtccgattACATTAC

add-G6 (SEQ ID NO: 2):

GTAATGTGtataatcctaattgatattggtttgggagttctaccaagagccttaaaactcttgactaCACATTAC

add-A6 (SEQ ID NO: 3):

GTAATGTGtataatcctaattgatattggtttgggagttctaccaagagccttaaaactcttgattaCACATTAC

gdg6-A8 (SEQ ID NO: 4):

GTAATGTacagggttagcataatgggctactgaccccgccgggaaacctatttcccgattACATTAC

gdg6-G8 (SEQ ID NO: 5):

GTAATGTacagggttagcataatgggctactgaccccgccgggaaacctatttcccgactACATTAC

Ydhl-G8 (SEQ ID NO: 6):

GTAATGTataacctcaataatattggtttgagggtgtctaccaggaaccgtaaaactctgactACATTAC

Ydhl-A6 (SEQ ID NO: 7):

GTAATGTGtataacctcaataatattggtttgagggtgtctaccaggaaccgtaaaactctgattaCACATTAC

yxj-A6 (SEQ ID NO: 8):

GTAATGTGtatatgatcagtaatatgggtctgattgtttctacctagtaaccgtaaaaactagattaCACATTAC

Ví dụ 2

Thiết kế và tổng hợp thư viện aptame.

Quy trình

Để tạo ra thư viện aptame, các nucleotit ở vị trí trong aptame mà được xác định từ cấu trúc tinh thể^{6, 7} là có tiềm năng tham gia vào liên kết phối tử được ngẫu nhiên hóa. để tạo điều kiện cho việc xây dựng cấu trúc aptame thành các công tắc ribo, vùng aptame được bọc sườn bởi các vùng ổn định với các vị trí cắt của enzym cắt giới hạn typ II (ví dụ, BsaI). Các oligonucleotit ultrame gồm 153 cặp bazơ này chứa trình tự aptame với các bazơ đã được ngẫu nhiên hóa được tổng hợp bởi IDT: GACTTCGGTCTCATCCAGAG-AATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATGTATANNNGCGTGGATATGG-CACGCNNGNNNNNCNCCGGGCACCGTAAATGTCCGACTACATTACGCACCATT-CTAAAGAATAACAGTGAAGAGACCAGACGG (N thể hiện các nucleotit ngẫu nhiên) (SEQ ID NO: 9). để tạo ra đa dạng hơn về trình tự ở thư viện aptame, các bazơ ở nhiều vị trí hơn có thể được ngẫu nhiên hóa. Trình tự hoàn toàn ngẫu nhiên cũng có thể được dùng để tạo ra thư viện aptame.

Kết quả

Như đã được bọc lộ trong Ví dụ 1, các tác giả sáng chế đã xây dựng thành công các công tắc ribo tổng hợp mà điều hòa sự biểu hiện của gen của động vật có vú đáp lại việc xử lý phối tử phân tử nhỏ. Một trong số các công tắc ribo xpt-G17 mà chứa aptame guanin xpt-G trong catxet biểu hiện gen dựa trên ghép nối. Bằng cách sử dụng luxiferaza làm gen thông báo, các tác giả sáng chế đã đạt được khoảng động lực học cao trong việc điều hòa gen đáp lại xử lý bằng guanin, với mức tăng 2000 ở nồng độ guanin cao. Khoảng động lực học cao chưa từng có này của hoạt tính điều hòa gen bởi các cấu trúc ghép nối khác gián tiếp qua aptame/phối tử tạo ra hệ thống để sàng lọc các aptame đối với phối tử mong muốn ở các tế bào của động vật có vú, hoặc sàng lọc phối tử mà liên kết và hoạt hóa các aptame đã biết.

xpt-G17 được chọn làm nền tảng để xây dựng thư viện công tắc ribo ban đầu. Cấu hình của trình tự oligonucleotit được thiết kế để thay thế aptame guanin xpt-G gốc theo các bước tách dòng dưới đây. Các nucleotit trong aptame guanin xpt-G ở vị trí mà là đã biết là quan trọng đối với liên kết guanin trên cơ sở phân tích tinh thể học được ngẫu nhiên hóa. Ban đầu, 10 vị trí được ngẫu nhiên hóa, mà thư viện tạo ra gồm 1.048.576 trình tự aptame. Khi nhiều hơn 10 vị trí được ngẫu nhiên hóa, thì các thư viện gồm nhiều hơn 10^6 trình tự có thể được tạo ra. Mặc dù trình tự khung của aptame guanin xpt-G được sử dụng một cách chọn lọc theo sáng chế để ngẫu nhiên hóa, phương thức tương tự có thể được áp dụng để tạo ra các thư viện aptame với các aptame đã biết khác, hoặc thậm chí các trình tự hoàn toàn ngẫu nhiên không có các phối tử đã biết. Mặc dù các tác giả sáng

chế đã chọn xpt-G17 làm nền tảng theo sáng chế, điều quan trọng là cần lưu ý rằng các công tắc ribo với các aptame khác nhau, hoặc các công tắc ribo trên cơ sở các cơ chế khác việc ghép nối cũng có thể được dùng làm nền tảng ban đầu để tạo ra các trình tự aptame đã được ngẫu nhiên hóa.

Ví dụ 3

Phân tách thư viện lớn gồm các aptame đã được ngẫu nhiên hóa thành các thư viện phụ nhỏ hơn gồm các aptame.

Quy trình

Các oligonucleotit (các oligo): bộ đoạn mỗi JF hoặc JR có phần trình tự 3' hỗ trợ cho các vùng ổn định ở các oligo aptame tổng hợp được và phần trình tự 5' chứa các trình tự oligo gồm 20 đơn vị ngẫu nhiên. Bộ đoạn mỗi F hoặc R hỗ trợ cho các trình tự oligo gồm 20 đơn vị ngẫu nhiên ở các đoạn mỗi JF hoặc JR. Tất cả các đoạn mỗi được tổng hợp ở IDT. Các đoạn mỗi JF được đánh dấu bằng biotin ở đầu tận cùng 5' (IDT). Các oligo đã tổng hợp được được tạo huyền phù trong nước không chứa ADNaza và ARNaza đến 100 μ M làm dung dịch gốc, và được pha loãng đến nồng độ mong muốn và định lượng bằng cách sử dụng máy Nanodrop hoặc phương pháp OliGreen (ThermoFisher).

Khuếch đại theo phương pháp PCR hai chu kỳ: Để bổ sung oligo-nhãn gắn đã được biotin hóa, khuếch đại theo phương pháp PCR hai chu kỳ được thực hiện bằng cách sử dụng kit PCR Pfx Platin theo quy trình của nhà sản xuất trong thể tích phản ứng 10 μ l. Các khuôn oligo được sử dụng với số lượng bản sao mong muốn trong phản ứng PCR (1 đến 5 bản sao cho mỗi trình tự oligo ở thư viện aptame). Đối với chu kỳ khuếch đại thứ nhất, chỉ các đoạn mỗi ngược JR được bao gồm. Việc khuếch đại được thực hiện ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 2 phút, sau đó 94°C trong thời gian 10 giây, ghép với chương trình chậm-tái từ 66°C đến 52°C giảm nhiệt độ 0,5°C mỗi phút. Tiếp đó, phản ứng polymeaza được mở rộng ở nhiệt độ 68°C trong thời gian 20 giây, tiếp theo là giảm xuống đến 4°C. Tiếp đó, 10 μ l hỗn hợp PCR không có khuôn nhưng chứa các đoạn mỗi thuận đã được gắn biotin (biotin-JF) được bổ sung vào ống nghiệm PCR chu kỳ thứ nhất để thực hiện chu kỳ khuếch đại thứ hai bằng cách áp dụng chính các bước PCR này. Các sản phẩm PCR là sẵn sàng để ủ với các hạt streptavidin.

Phân lập các oligonucleotit đã được gắn biotin (các oligo): 2x dung dịch đệm liên kết và rửa (dung dịch đệm BW) được tạo ra chứa 1x dung dịch đệm TE (do Ambion cung cấp) và 2M NaCl. Dynabeads M-270 Streptavidin (do ThermoFisher cung cấp) (các hạt

SA) được phong bế bằng 20 μ M dung dịch ARN vận chuyển của nấm men (do Ambion cung cấp) trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, và rửa bằng dung dịch đệm BW 1x hai lần, và tạo huyền phù lại trong cùng thể tích dung dịch đệm BW 2x như thể tích ban đầu của hạt được sử dụng. 50 μ l hạt đã được xử lý này được bổ sung vào các sản phẩm PCR cùng với 100 μ l dung dịch đệm BW 2x và 30 μ l nước. 200 μ l hỗn hợp oligo đã được gắn biotin và hạt SA được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 60 phút, sau đó hạt được làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 5 phút, làm lạnh ngay lập tức trên nước đá và được rửa một lần bằng dung dịch đệm BW 1x, hai lần bằng nước trong thời gian 5 phút theo quy trình của nhà sản xuất. Dung dịch rửa được loại bỏ càng nhiều càng tốt, và hạt đã rửa là sẵn sàng cho phản ứng PCR.

Các PCR đặc hiệu đối với đuôi gắn nhãn trình tự oligo: hạt với các sản phẩm PCR được gắn biotin được bổ sung vào tổng cộng 50 μ l hỗn hợp PCR bằng cách sử dụng kit PCR Pfx Platin. Các đoạn mồi là hỗn hợp gồm bộ đoạn mồi F và R. PCR được làm nóng sơ bộ ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 2 phút, đưa đến 28 chu kỳ 94°C trong thời gian 15 giây, 62°C trong thời gian 30 giây, 68°C trong thời gian 20 giây, và mở rộng thêm ở nhiệt độ 68°C trong thời gian 2 phút. Sản phẩm PCR được làm nguội đến 12°C và sẵn sàng cho vòng PCR thứ hai. Đối với vòng khuếch đại thứ hai theo phương pháp PCR, 1 μ l sản phẩm PCR từ vòng PCR thứ nhất được dùng làm khuôn, và một cặp đoạn mồi F và R được dùng để khuếch đại các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu bằng các trình tự bổ trợ. Hỗn hợp phản ứng PCR được làm nóng sơ bộ ở nhiệt độ 94°C, và được khuếch đại bằng 25 chu kỳ 94°C trong thời gian 15 giây, 60°C trong thời gian 30 giây, 68°C trong thời gian 20 giây, và mở rộng thêm ở nhiệt độ 68°C trong thời gian 2 phút.

Kết quả

Mặc dù việc chọn lọc *in vitro* bằng cách áp dụng phát triển có hệ thống của các phối tử bằng cách làm giàu theo số mũ (SELEX)^{8,9} đã được áp dụng rộng rãi để sàng lọc các thư viện aptame lớn thường có 10¹³ đến 10¹⁴ trình tự để tạo ra nhiều aptame cho nhiều loại phối tử bao gồm các chất chuyển hóa, các đồng tác nhân vitamin, các ion kim loại, các protein và thậm chí cả các tế bào nguyên vẹn¹⁰, các phương pháp sàng lọc dựa trên tế bào của các thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa lớn như vậy chưa được phát triển. Hơn thế nữa, một vài aptame được tạo ra bởi SELEX đã thể hiện có hiệu quả trong môi trường tế bào, nhấn mạnh tầm quan trọng của các aptame sàng lọc trong môi trường tế bào nơi chúng sẽ cần thực hiện chức năng. Nhằm để các aptame chọn lọc làm việc trong các tế bào, liên kết của aptame cụ thể với phối tử của nó phải có kết quả chức năng – mà

không thử được thông qua SELEX, mà chọn lọc các aptame chỉ dựa trên liên kết phối tử trong các điều kiện *in vitro*. Một thách thức đối với việc phát triển sàng lọc aptame dựa trên tế bào của động vật có vú là khoảng điều hòa gen động lực học thấp của các công tắc ribo dựa trên aptame đáp lại việc xử lý phối tử. Ngoài hạn chế cơ bản này, hiệu quả tải nạp gen nội tại thấp ở các tế bào của động vật có vú gây ra một cản trở khác đối với việc sàng lọc các thư viện lớn hơn 10^5 trình tự. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã phát triển các công tắc ribo tổng hợp mà có thể khiến tăng vài nghìn lần mức độ biểu hiện gen sau khi xử lý phối tử. Khoảng động lực học cao của việc điều hòa gen là cơ sở cho hệ thống trên cơ sở tế bào để sàng lọc aptame/phối tử. Nhằm chọn lọc các aptame ở các tế bào nhân chuẩn từ các thư viện aptame lớn mà có mức độ đa dạng cao về trình tự, sáng chế đề xuất nhiều cách và phương thức chia/tách các thư viện aptame lớn thành các thư viện phụ nhỏ hơn mà có thể được tách dòng thành catxet công tắc ribo để tạo ra các thư viện plasmid mà dễ sàng lọc thông qua các thử nghiệm dựa trên tế bào của động vật có vú.

Cách thức tách các thư viện aptame lớn trước hết là bổ sung cặp trình tự duy nhất ở cả đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của các trình tự oligo aptame tổng hợp đã được ngẫu nhiên hóa (như được bộc lộ trong Ví dụ 2). Ở bước thứ hai của cách thức này, các trình tự aptame đã được gắn (đã được gắn thẻ đánh dấu/đã được đánh dấu) với các trình tự oligo duy nhất có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng một cặp đoạn mồi hỗ trợ cho mỗi cặp thẻ đánh dấu trình tự, nhờ đó tạo ra các thư viện phụ khác nhau gồm các aptame (hình 3a). Quy trình gắn thẻ đánh dấu hai bước này và PCR có thể được lặp lại để tách thư viện này đến kích thước mong muốn.

Để gắn cặp trình tự duy nhất vào khuôn, các tác giả sáng chế đã phát triển nhiều cách thức (hình 3b). Một cách thức là áp dụng PCR để kết hợp các trình tự duy nhất vào khuôn (cách PCR). Các cách thức khác bao gồm buộc thẻ đánh dấu trình tự đơn sợi vào khuôn đơn sợi bằng cách sử dụng T4 ARN ligaza và buộc bằng các thẻ đánh dấu T4 ADN ligaza trình tự sợi đôi vào các khuôn sợi đôi mà được tạo ra bằng cách khuếch đại theo phương pháp PCR các khuôn oligonucleotit sợi đơn (cách buộc). Các tác giả sáng chế đã phát triển và thử cách thức PCR hai chu kỳ (hình 3c), và hiện đang trong quy trình thử nghiệm cách buộc để bổ sung các thẻ đánh dấu trình tự duy nhất vào.

Để áp dụng cách PCR để gắn thẻ đánh dấu trình tự để tạo ra thư viện aptame đã được gắn thẻ đánh dấu, một bộ đoạn mồi PCR (JF và JR) được thiết kế. Bộ đoạn mồi này chứa thẻ dấu này trình tự ở phần 5' của các đoạn mồi, và ở phần 3' của các đoạn mồi, trình tự mà hỗ trợ cho vùng ổn định ở các oligo aptame tổng hợp được. Để tránh tính hỗn

tạp đã tạo ra bởi phương pháp PCR thông thường nhiều chu kỳ¹¹ bằng cách sử dụng số lượng lớn bản sao của khuôn, PCR hai chu kỳ được phát triển để gắn trình tự thẻ đánh dấu ở một đầu tận cùng của khuôn ở từng chu kỳ (hình 3c). Theo phương pháp PCR hai chu kỳ này, số bản sao của khuôn oligo đã được ngẫu nhiên hóa được giữ tối thiểu để làm giảm cơ hội đối với mỗi khuôn được gắn với nhiều hơn một cặp trình tự thẻ đánh dấu. Để phân lập và tinh chế các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu, các tác giả sáng chế đã đánh dấu các đoạn môi JF bằng các phân tử biotin, sao cho hạt streptavidin có từ tính có thể được sử dụng để tách các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu đã được gắn biotin ra khỏi phần còn lại của các thành phần phản ứng (hình 3d). Do số bản sao của khuôn thấp, các tác giả sáng chế bắt đầu với gắn thẻ đánh dấu theo phương pháp PCR, các khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu đã được gắn biotin và đã được phân lập được khuếch đại và được mở rộng theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm một nhóm đoạn môi (các đoạn môi J và F) mà là đặc hiệu với các trình tự thẻ đánh dấu đã được gắn vào các khuôn, tạo ra thư viện aptame mà có cặp trình tự duy nhất ở các đầu tận cùng (thư viện đã được gắn thẻ đánh dấu gồm các aptame đã được ngẫu nhiên hóa). Tiếp đó, sản phẩm PCR này có tác dụng làm khuôn cho PCR với một cặp đoạn môi J và R để khuếch đại từng khuôn đã được gắn thẻ đánh dấu, bằng cách đó tạo ra thư viện phụ của thư viện aptame ban đầu.

Theo nghiên cứu thử nghiệm khi 2 đoạn môi JF đã được đánh dấu bằng biotin (JF1 và JF2) và 8 đoạn môi JR ngược (JR1 đến JR8) được sử dụng, tạo ra tổng cộng 16 cặp thẻ đánh dấu trình tự duy nhất. Sau khi tạo ra thư viện thẻ dấu này theo phương pháp PCR với các khuôn ở 1, 2,3 hoặc 4,6 bản sao lần lượt thể hiện 63%, 90% hoặc 99% thư viện aptame ban đầu đã được ngẫu nhiên hóa, các đoạn môi khác nhau được dùng để thử nghiệm cách thức tách. Như được thể hiện trên mảng bên trái của Hình 3e, các khuôn đã được gắn thẻ dấu được khuếch đại nhờ các đoạn môi hỗ trợ cho vùng ổn định (các đoạn môi đa năng) ở aptame, mà khuếch đại từng khuôn ở thư viện này. Khi một cặp đoạn môi (F1 và R1) mà là đặc hiệu với các trình tự thẻ đánh dấu được bổ sung vào (mảng giữa), nhưng không phải là cặp đoạn môi (F3 và R1) mà không được bao gồm vào việc gắn thẻ dấu này (mảng bên phải) được sử dụng, các khuôn đã được gắn thẻ dấu được khuếch đại với lượng thấp hơn nhiều so với sản phẩm đã được khuếch đại với đoạn môi đa năng, chỉ biểu thị một phần (theo tỷ lệ 1/16) của thư viện này được khuếch đại. Do đó, thư viện ban đầu được tách thành thư viện phụ nhỏ hơn.

Ví dụ 4

Độ nhạy của thử nghiệm trên cơ sở tế bào để sàng lọc thư viện.

Quy trình:

Các cấu trúc ADN: Các cấu trúc ADN plasmit chứa công tắc ribo xpt-G17 được pha loãng trong cấu trúc ADN SR-Mut đến tỷ lệ khác giữa hai cấu trúc ADN này. Tiếp đó, các cấu trúc hỗn hợp G17 này và các ADN của plasmit của SR-mut được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK 293. Việc chuyển nhiễm và thử nghiệm luxiferaza được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Độ nhạy của thử nghiệm trên cơ sở tế bào để sàng lọc thư viện xác định mức độ phức tạp hoặc mức độ kích thước lớn của thư viện plasmit aptame-công tắc ribo có thể nằm trong khoảng tối thiểu 1 kết quả thành công tách khỏi phần còn lại của thư viện này trong sàng lọc. Thử nghiệm này có thể là thử hoạt tính của luxiferaza, cường độ huỳnh quang của protein huỳnh quang hoặc hormon sinh trưởng/giải phóng xytokin, tùy theo gen thông báo được chọn, và các yếu tố di truyền có thể được phân phối theo quy trình chuyển nhiễm ngắn hoặc bằng cách tải nạp virus, ví dụ AAV, adeno virus, lentivirus v.v..

Trong sáng chế này, các tác giả sáng chế đã chọn quy trình chuyển nhiễm ngắn để phân phối ADN plasmit, và sử dụng luxiferaza của con đom đóm làm gen thông báo bằng cách sử dụng cấu trúc xpt-G17 làm vật truyền đối chứng công tắc ribo tích cực, thử nghiệm mà có đã được thử rộng rãi và áp dụng trong quá trình phát triển công tắc ribo xpt-G17 ở các tế bào của động vật có vú. Cấu trúc SR-mut được dùng làm vật truyền đối chứng âm tính mà có cùng các yếu tố di truyền như cấu trúc xpt-G17, chỉ khác không có trình tự aptame guanin, do đó không hoạt hóa sự biểu hiện gen đáp lại xử lý bằng guanin. Hai cấu trúc này được trộn với nhau để bắt chước tình thế thư viện gom được, mặc dù thư viện công tắc ribo thật là phức tạp hơn do mức đa dạng phân tử rộng đã được tạo ra bởi quá trình ngẫu nhiên hóa nucleotit. Các tế bào đã được chuyển nhiễm với 100% ADN cấu trúc xpt-G17 gây ra mức tăng 2000 lần hoạt tính của luxiferaza khi xử lý bằng 500 μ M guanin khi so với tế bào không được xử lý. Khi ADN cấu trúc xpt-G17 được pha loãng bằng ADN cấu trúc SR-mut, các tế bào đã được chuyển nhiễm với ADN hỗn hợp này thể hiện số lần tăng hoạt tính của luxiferaza thấp hơn. Như được thể hiện trên hình 3, số lần tăng giảm khi tỷ lệ giữa cấu trúc xpt-G17 đáp ứng guanin so với cấu trúc SR-mut âm tính không đáp ứng giảm, nhưng vẫn có thể tạo ra mức tăng 2,3 lần khi có 1 cấu trúc dương

tính trong số 2000 phân tử, biểu thị xác suất của thu hồi 1 công tắc ribo đáp ứng phối tử từ hỗn hợp gồm các công tắc ribo không đáp ứng phối tử.

Đối với các thử nghiệm ngoài thử nghiệm nêu trên, mức độ nhạy của thử nghiệm này nên được thử để tạo ra hướng dẫn nhằm xác định kích thước của vốn thư viện phụ cần được sàng lọc.

Ví dụ 5

Xây dựng thư viện plasmid công tắc ribo trên cơ sở aptame đã được gom vốn và tách thư viện công tắc ribo lớn thành thư viện phụ nhỏ hơn để sàng lọc.

Quy trình:

Việc dựng thư viện plasmid công tắc ribo đã gom vốn được: Các oligo ultrame chứa các trình tự aptame với các bazơ đã được ngẫu nhiên hóa (xem Ví dụ 2 về thiết kế và thành phần của trình tự) được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng kit Platin Pfx (do Invitrogen cung cấp) để tạo ra các đoạn ADN sợi đôi, và sản phẩm PCR thu được được cho chạy trên gel 4% agarosa. ADN với kích cỡ 153 cặp bazơ được tinh chế bằng gel (do Qiagen cung cấp) và được tiêu bằng enzym BsaI (NEB). Tiếp đó, đoạn ADN đã được tiêu bằng BsaI được buộc vào vật truyền thể nhận đã được tiêu bằng BsaI (mDHFR-Luci-Thể nhận) như được mô tả trong Ví dụ 1 theo tỷ lệ 1:5 giữa vật truyền so với phần cài xen bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza (do Roche cung cấp). Các tế bào có năng lực electroMAXDH5 α -E được chuyển nhiễm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen) với sản phẩm buộc và được cấy lên đĩa aga. Các khuẩn lạc vi khuẩn được tạo vốn và gom, và ADN được chiết để thu được thư viện plasmid của các công tắc ribo (P1).

Cách thức tương tự được áp dụng để tạo ra thư viện công tắc ribo của plasmid (P2) nhỏ hơn, trong đó các bazơ nucleotit ở 5 vị trí trong aptame được phân chia một cách ngẫu nhiên tạo ra tổng cộng 1024 trình tự aptame khác nhau (trong đó N biểu thị vị trí đã được ngẫu nhiên hóa): GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTC-AGTAGAAGGTAATGTATANNNGCGTGGATATGGCACGCNNGTTTCTACCGG-GCACCGTAAATGTCCGACTACATTACGCACCATTCTAAAGAATAACA-GTGAAGAGACCAGACGG (SEQ ID NO: 10)

Biến nạp DH5 α có năng lực hóa học: 227pg ADN plasmid được dùng để biến nạp 50 μ l tế bào có năng lực để thu được ADN plasmid và tế bào vi khuẩn theo tỷ lệ 1:10. Các tế bào đã được biến nạp được cấy vào các đĩa aga sau khi được ủ ở 37°C không lắc trong

thời gian 30 phút, và các khuẩn lạc được tạo vốn và gom để chiết ADN bằng cách sử dụng kit điều chế mini định dạng 96 (do Qiagen cung cấp) để thu được thư viện phụ công tắc ribo của plasmit đã được tạo vốn.

Giải trình tự thế hệ tiếp theo (Next Generation Sequencing - NGS): ADN của plasmit từ các thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp hoặc cấp ba được dùng làm khuôn, và các đoạn môi dưới đây được dùng để tạo ra các amplicon PCR mà chứa các trình tự của aptame đã được ngẫu nhiên hóa: DHFR_F: 5'-GACTTCGGTCTCATCCAGAGAAT-GAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATG-3' (SEQ ID NO: 11); IVS_R: 5'-CCG-TCTGGTCTCTTCACTGTTATTCTTTAGAATGGTGCG-3' (SEQ ID NO: 12). Các sản phẩm PCR được đưa đến bước NGS bằng cách sử dụng nền tảng đầu tận cùng ghép cặp Illumina MiSeq 2x150bp để tạo ra khoảng 700K đọc cho từng mẫu và phân tích tin sinh học tiếp theo để nhận diện trình tự duy nhất và tính toán mức dư tương đối (dịch vụ do Genewiz cung cấp). Các trình tự mà thể hiện 12, hoặc nhiều hơn 12, số đọc từ việc thực hiện giải trình tự được xem là các trình tự thật.

Kết quả

Để sàng lọc các aptame theo thử nghiệm trên cơ sở tế bào, thư viện plasmit của công tắc ribo được tạo ra bằng cách tách dòng thư viện aptame vào vật truyền mDHFR-Luci-Thể nhận (hình 5a). Các cấu trúc tạo ra được chứa cùng cấu hình của yếu tố di truyền như ở cấu trúc xpt-G17, với khác biệt duy nhất là ở các trình tự aptame. Các tác giả sáng chế bắt đầu với thư viện aptame đã tạo ra được như được mô tả trong Ví dụ 2, thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa chứa của 10^6 trình tự duy nhất. Để đảm bảo mức độ thể hiện thư viện aptame ban đầu cao hơn 99,9%, tổng cộng $7,5 \times 10^6$ khuẩn lạc, tức là gấp 7,5 lần số lượng trình tự ở thư viện aptame, được gom từ các đĩa aga. ADN của plasmit chiết được từ được gom các khuẩn lạc tạo nên thư viện plasmit (P1) bao gồm 10^6 công tắc ribo duy nhất.

Để chia các thư viện plasmit thành các thư viện phụ mà là đủ nhỏ để được sàng lọc bằng cách áp dụng thử nghiệm phát triển được trên cơ sở tế bào, cách thức được áp dụng, như được thể hiện trên Hình 5b, bao gồm việc tạo vốn số lượng ít hơn của các khuẩn lạc của vi khuẩn đã được biến nạp và chiết ADN để tạo ra thư viện phụ công tắc ribo của plasmit. Quy trình chia các thư viện plasmit này có thể được thực hiện vài vòng để đạt được kích thước cần thiết của thư viện phụ, trong đó hiện tượng tích cực duy nhất (tức là liên kết aptame cụ thể/phối tử dẫn đến sự biểu hiện của gen thông báo) có thể được

phát hiện dựa trên độ nhảy của thử nghiệm trên cơ sở tế bào phát triển được để sàng lọc thư viện, lần lượt tạo ra thư viện phụ sơ khai, thứ cấp hoặc cấp ba. Kích thước của thư viện phụ được tính là $n(\text{thư viện phụ}) = m (\text{số lần tăng mức độ thể hiện}) * N (\text{kích thước thư viện ban đầu})/d (\text{số lần chia})$. Thuật ngữ “số lần chia” thể hiện tổng số thư viện phụ cần nhận được, và có thể là số lượng mong muốn bất kỳ. Trong sáng chế này, các tác giả sáng chế đã chọn số lần chia là 100 để dễ tính toán. Đối với vòng chia thứ nhất, 6×10^6 khuẩn lạc được gom, mà là gấp 6 lần số lượng công tắc ribo trong thư viện plasmit ban đầu để đạt được mức thể hiện cao hơn 99% (10^6). Đối với vòng chia thứ hai, 1 lần thể hiện thư viện phụ sơ khai được chọn. Đối với thư viện plasmit có 10^6 công tắc ribo, các tác giả sáng chế đã xây dựng (P1), trong đó $N=10^6$, $m=6$, $d=100$, kích thước của từng thư viện phụ là $n=6 \times 10^4$. Tổng cộng 6×10^6 khuẩn lạc vi khuẩn được gom vào 100 ống nghiệm riêng rẽ và ADN chiết được từ từng ống nghiệm riêng rẽ để tạo ra thư viện phụ sơ khai gồm các công tắc ribo của plasmit (P1S_001 đến P1S_100). Bằng cách áp dụng cùng cách thức này và bắt đầu, ví dụ, với thư viện phụ P1S_001, thư viện phụ sơ khai được chia tiếp thành 100 thư viện phụ thứ cấp nhỏ hơn được gọi là P1S_001_001 đến P1S_001_100. Do đó, bằng cách thực hiện hai vòng chia, thư viện phụ plasmit thứ cấp được tạo ra với 600 công tắc ribo trong mỗi thư viện phụ này. Thư viện phụ công tắc ribo có thể được chia tiếp vòng thứ 3 của quy trình chia để tạo ra thư viện phụ plasmit cấp ba.

Cùng cách thức này được áp dụng để chia thư viện công tắc ribo của plasmit P2 mà chứa 1024 trình tự aptame duy nhất. Bằng cách gom 100 phần gồm tổng cộng 5000 khuẩn lạc, 100 thư viện phụ sơ khai P2S_001 đến P2S_100 được tạo ra, trong đó mỗi thư viện phụ chứa khoảng 50 công tắc ribo.

Để xác định thành phần và chất lượng của các thư viện công tắc ribo tạo ra được như đã nêu trên, việc giải trình tự thuộc thể hệ tiếp theo (NGS) được thực hiện trên thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp của plasmit mà có lẽ chứa 600 trình tự công tắc ribo trong từng thư viện phụ. Bốn thư viện phụ thứ cấp được chọn một cách ngẫu nhiên, trong đó hai thư viện trong số các thư viện phụ thứ cấp được tạo ra từ thư viện phụ sơ khai P1S_003, và hai thư viện phụ thứ cấp còn lại được tạo ra lần lượt từ thư viện phụ sơ khai P1S_007 và P1S_048. Như được thể hiện trên hình 5c, mỗi thư viện phụ thứ cấp chứa khoảng 500 hoặc 600 trình tự duy nhất, phù hợp với số lượng khuẩn lạc mà được gom để tạo ra thư viện phụ thứ cấp. Phân tích tiếp dữ liệu NGS cho thấy rằng giữa hai thư viện phụ thứ cấp (P1S_003_004 và P1S_003_041) mà được tạo ra từ cùng thư viện phụ sơ khai (P1S_003), cả hai thư viện này có chung 39 trình tự (hình 5d). Khi so sánh hai thư

viện phụ thứ cấp, P1S_003_004 và P1S_007_021, mà thu được từ thư viện phụ sơ khai khác nhau, P1S_003 và P1S_007, cả hai thư viện phụ này chỉ chung 3 trình tự (hình 5e). Các kết quả này cho thấy rằng bằng cách áp dụng cách thức nêu trên, các thư viện phụ công tắc ribo của plasmit được tạo ra với số lượng mong muốn của các trình tự duy nhất mà là sẵn sàng cho sàng lọc trên cơ sở tế bào của động vật có vú.

Ví dụ 6

Sàng lọc trên cơ sở tế bào của động vật có vú cho các aptame mới đối với các phối tử lựa chọn.

Như được bộc lộ trong Ví dụ 5, 100 thư viện phụ plasmit ban đầu (P1S_001 đến P1S_100), bao gồm 60k công tắc ribo ở mỗi vốn, được xây dựng, và 100 thư viện phụ plasmit thứ cấp (P1S_001_001 đến P1S_001_100) bao gồm 600 công tắc ribo trong mỗi thư viện phụ được tạo ra bằng cách chia tiếp thư viện phụ sơ khai P1S_001 bằng cách áp dụng cùng cách thức đó. Các thư viện đã được tạo vốn có thể được sắp hàng trong định dạng 96 lỗ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sàng lọc hiệu suất cao. Việc sàng lọc sơ bộ được thực hiện, bằng cách áp dụng thử nghiệm gen thông báo luxiferaza như được mô tả trong Ví dụ 1, đối với các thư viện phụ sơ khai P1S_001 đến 006 cũng như thư viện phụ của P1S_001, đối với guanin, mà là đối với trình tự aptame ban đầu, làm phối tử được thử nghiệm. Mức độ hoạt tính ban đầu của luxiferaza tạo ra được bởi các cấu trúc từ thư viện phụ sơ khai hoặc thư viện phụ thứ cấp thay đổi ở mức độ đáng kể so với hoạt tính đó của cấu trúc xpt-G17 (dữ liệu không được thể hiện), cho thấy rằng các thay đổi về trình tự aptame bằng cách ngẫu nhiên hóa các bazơ ở các vị trí chọn lọc tác động đến việc đưa vào/loại bỏ exon chứa codon dừng ở mức độ khác nhau, nhờ đó tác động đến mức biểu hiện luxiferaza gốc. Sau khi xử lý bằng guanin, mặc dù các tế bào đã được chuyển nhiễm với thư viện phụ sơ khai 60k P1S_005 tạo ra mức tăng gấp 1,8 lần hoạt tính của luxiferaza so với các tế bào chưa được xử lý (hình 6a), mức tăng gấp hơn 2 lần luxiferaza không được phát hiện khi sử dụng guanin làm phối tử. Tuy nhiên, 7 trong số 100 thư viện phụ thứ cấp khiến tăng gấp hơn 2 lần hoạt tính của luxiferaza sau khi được xử lý bằng guanin, trong đó thư viện phụ P1S_001_075 khiến tăng gấp 7,8 lần (hình 6b). Theo thử nghiệm về mức độ nhạy được bộc lộ trong Ví dụ 4, mức tăng 6,3 lần được phát hiện khi có 1 công tắc ribo xpt-G17 trong số 500 phân tử đáp ứng không là phối tử. Trên cơ sở thí nghiệm về độ nhạy này, kết quả (7,8 lần) từ sàng lọc sơ bộ này đối với thư viện phụ P1S_001_075 cho thấy rằng có 1 công tắc ribo trong số 600 là tương đương về mặt chức

năng với xpt-G17, hoặc có vài công tắc ribo yếu hơn mà tổng của chúng gây tăng hoạt tính của luxiferaza ở mức tương đương với mức tăng của xpt-G17.

Để thể hiện hơn nữa khả năng áp dụng sàng lọc trên cơ sở tế bào của động vật có vú theo sáng chế đối với các công tắc ribo chứa aptame chức năng và để phát hiện ra các aptame mới với hoạt tính tốt hơn đáp lại phôi tử mong muốn, thư viện phụ của thư viện công tắc ribo của plasmid P2 được sàng lọc theo định dạng 96 lỗ bằng NAD⁺. Các bazo nucleotit ở các vị trí đã được ngẫu nhiên hóa ở aptame xpt-guanin đã được liên hệ với việc điều chỉnh hoạt tính của công tắc ribo và được gọi là hộp điều chỉnh (Stoddard, et al. *J Mol Biol.* 2013 May 27; 425(10):1596-611). Do đó, các thay đổi của các nucleotit tại các vị trí này có tiềm năng tạo ra các trình tự mà làm thay đổi hoạt tính của công tắc ribo đáp lại việc xử lý phôi tử. Do bản chất của guanin và khả năng áp dụng *in vivo* thấp của nó, NAD⁺ được chọn làm phôi tử cho các aptame tiềm năng mới. Việc lựa chọn phôi tử này là dựa trên kết quả nêu trên từ việc sàng lọc thư viện hợp chất prestwick đối với công tắc ribo gốc xpt-G17, và phát hiện ra rằng NAD⁺ có thể điều hòa công tắc ribo guanin, khiến tăng khoảng 40 lần ở nồng độ 100 μ M. Với cố gắng để tạo ra các trình tự aptame mà có hoạt tính tốt hơn của công tắc ribo đối với NAD⁺, các tác giả sáng chế tạo ra và sàng lọc thư viện phụ P2 (có các thay đổi của các nucleotit ở vị trí 5 nêu trên ở aptame) bằng cách sử dụng luxiferaza làm gen thông báo. Như được thể hiện trên hình 6c, nhiều thư viện phụ, khoảng 50 công tắc ribo ở mỗi thư viện phụ, khiến tăng mức độ biểu hiện luxiferaza gấp nhiều hơn 10 lần đáp lại việc xử lý bằng 100 μ M NAD⁺, với một trong số thư viện phụ, P2S_002, khiến tăng 37 lần, trong khi một cấu trúc công tắc ribo xpt-G17 thể hiện mức tăng 32 lần đáp lại xử lý bằng NAD⁺ ở cùng một nồng độ.

Các kết quả sàng lọc này biểu thị rằng trong số khoảng 50 công tắc ribo trong thư viện phụ mà khiến tăng mức biểu hiện luxiferaza nhiều hơn 10 lần, có các công tắc ribo mà có thể đem lại mức tăng ít nhất 10 lần, giả sử rằng tất cả các công tắc ribo trong thư viện này đều đáp ứng với xử lý bằng NAD⁺. Trong thư viện phụ P2S_002 mà khiến tăng 37 lần, mà là cao hơn số lần tăng tạo ra được bởi G17, có ít nhất 1 công tắc ribo mà thực hiện chức năng tốt hơn nhiều G17. Để chứng minh điều này rõ hơn, 96 cấu trúc đơn thu được từ thư viện phụ P2S_002 được sàng lọc. Như được thể hiện trên hình 6d, mặc dù nhiều cấu trúc mất hoặc gây mức tăng thấp hơn G17, nhiều cấu trúc đơn đem lại mức tăng cao hơn cấu trúc G17, cho thấy rằng các thay đổi nucleotit ở hộp điều chỉnh tác động đáng kể đến hoạt tính của công tắc ribo đáp lại việc xử lý bằng phôi tử ở tế bào. Nhờ áp dụng cách này, các tác giả sáng chế đã xác định được nhiều trình tự hộp điều chỉnh khác

nhau (như được thể hiện trong Bảng 2), mà với chúng các công tắc ribo đem lại mức tăng luxiferaza cao hơn cấu trúc G17 sau khi được xử lý bằng NAD⁺, trong đó nhiều trình tự aptame tạo ra mức tăng cao hơn 100 lần.

Bảng 2. Các công tắc ribo với mức độ biểu hiện cao hơn của gen thông báo ở các tế bào của động vật có vú đáp lại phối tử, NAD⁺. Các trình tự hộp điều chỉnh được gạch chân.

SEQ ID NO:	Cấu trúc	Trình tự
13	G17	ATAATCGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
14	#02	ATAACCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
15	#16	ATAGCCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
16	#17	ATAAGGGCGTGGATATGGCACGCTCGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
17	#21	ATAAATGCGTGGATATGGCACGCATGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
18	#26	ATAAGCGCGTGGATATGGCACGCGCGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
19	#29	ATAGTGGCGTGGATATGGCACGCCAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
20	#31	ATAAAGGCGTGGATATGGCACGCCGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
21	#33	ATAGTTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
22	#36	ATAGCGGCGTGGATATGGCACGCTGGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
23	#41	ATAATGGCGTGGATATGGCACGCTAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
24	#46	ATAATTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
25	#54	ATAATTGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
26	#61	ATAATCGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
27	#69	ATAACTGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGGCAC CGTAAATGTCCGACT

Một trong số các cấu trúc mới này, #46, được thử nghiệm tiếp. Như được thể hiện trên hình 6e và hình 6f, cấu trúc mới #46 đáp ứng với việc xử lý bằng NAD⁺ theo kiểu phụ thuộc liều lượng và thể hiện sự cải thiện tốt hơn về độ biểu hiện của gen thông báo cũng như số lần gia tăng so với cấu trúc G17. Các cấu trúc mới cũng cải thiện mức độ điều hòa gen đáp lại xử lý bằng guanin (dữ liệu không được thể hiện).

Do đó, sáng chế đề xuất cách thức có thể chia thư viện tương đối lớn công tắc ribo thành thư viện phụ công tắc ribo nhỏ hơn mà dễ sàng lọc thông qua thử nghiệm dựa trên tế bào của động vật có vú. Hơn thế nữa, từ thư viện công tắc ribo, các trình tự mới mà có hoạt tính công tắc ribo tốt hơn ở các tế bào của động vật có vú được phát hiện.

Các tài liệu viện dẫn:

1. Mandal, Maumita, Benjamin Boese, Jeffrey E. Barrick, Wade C. Winkler, and Ronald R. Breaker. "Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus Subtilis* and Other Bacteria." *Cell* 113, no. 5 (May 30, 2003): 577–86.
2. Mandal, Maumita, and Ronald R. Breaker. "Adenin Riboswitches and Gene Activation by Disruption of a Transcription Terminator." *Nature Structural & Molecular Biology* 11, no. 1 (January 2004): 29–35. doi:10.1038/nsmb710.
3. Mulhbach, Jerome, và Daniel A. Lafontaine. "Ligand Recognition Determinants of Guanine Riboswitches." *Nucleic Acids Research* 35, no. 16 (2007): 5568–80. doi:10.1093/nar/gkm572.
4. Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker, and Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- và Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, no. 12 (December 2004): 1729–41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.
5. Edwards, Andrea L., and Robert T. Batey. "A Structural Basis for the Recognition of 2'-deoxyguanosine by the Purine Riboswitch." *Journal of Molecular Biology* 385, no. 3 (January 23, 2009): 938–48. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.074.
6. Batey, Robert T., Sunny D. Gilbert, and Rebecca K. Montange. "Structure of a Natural Guanine-Responsive Riboswitch Complexed with the Metabolite Hypoxanthine." *Nature* 432, no. 7015 (November 18, 2004): 411–15. doi:10.1038/nature03037.
7. Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker, and Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, no. 12 (December 2004): 1729–41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.

8. Ellington, A. D., and J. W. Szostak. “*In vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands.” *Nature* 346, no. 6287 (August 30, 1990): 818–22. doi:10.1038/346818a0.
9. Tuerk, C., and L. Gold. “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase.” *Science* (New York, N.Y.) 249, no. 4968 (August 3, 1990): 505–10.
10. Ozer, Abdullah, John M. Pagano, and John T. Lis. “New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization.” *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (2014): e183. doi:10.1038/mtna.2014.34.
11. Kebschull, Justus M., and Anthony M. Zador. “Sources of PCR-Induced Distortions in High-Throughput Sequencing Data Sets.” *Nucleic Acids Research* 43, no. 21 (December 2, 2015): e143. doi:10.1093/nar/gkv717.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chọn lọc aptame mà liên kết với phối tử ở các tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:
 - (a) chuẩn bị thư viện aptame,
 - (b) đưa các thành viên của thư viện aptame vào catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử nhằm tạo ra thư viện công tắc ribo,
 - (c) đưa catxet polynucleotit bao gồm thư viện công tắc ribo vào các tế bào nhân chuẩn in vitro, và
 - (d) cho tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với phối tử, và
 - (e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo,

trong đó catxet polynucleotit chứa exon ghép nối theo cách khác, được bọc sườn bởi intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3', và công tắc ribo chứa (i) vùng tác động có thân mà bao gồm trình tự vị trí ghép nối 5' của intron ở đầu tận cùng 3', và (ii) aptame, trong đó exon ghép nối theo cách khác chứa codon dừng mà nằm trong cùng khung với gen thông báo khi exon ghép nối theo cách khác được ghép nối vào ARN thông tin của gen thông báo.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thư viện aptame chứa các aptame có một hoặc nhiều nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phối tử là phân tử nhỏ.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phối tử là phân tử mà được tạo ra bởi tế bào nhân chuẩn được chọn từ nhóm bao gồm chất chuyển hóa, axit nucleic, vitamin, đồng tác nhân, lipit, monosacarit, và thể mang thông tin thứ hai.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào nhân chuẩn được chọn từ tế bào của động vật có vú, tế bào của côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào nấm men.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm protein huỳnh quang, luxiferaza, β -galactosidaza và peroxidaza của cây củ cải cay.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mức độ biểu hiện của gen thông báo lớn hơn khoảng 10 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu với aptame so với mức độ biểu hiện của các gen thông báo khi phối tử không có mặt.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' có nguồn gốc từ intron 2 của gen β -globin của người.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 50 nucleotit đến 300 nucleotit.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 125 nucleotit đến 240 nucleotit.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thân của vùng tác động có chiều dài khoảng từ 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thân của vùng tác động có chiều dài từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó exon ghép nối theo cách khác thu được từ nhóm bao gồm exon 2 của gen dihydrofolat reductaza của người, exon 5 đột biến của khối u Wilms 1 của người, exon 16 của protein kinaza II delta phụ thuộc canxi/calmodulin của chuột, và SIRT1 exon 6.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó exon ghép nối theo cách khác là exon 2 được cải biến từ DHFR của người.
15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó exon ghép nối theo cách khác là loại tổng hợp.
16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó exon ghép nối theo cách khác được cải biến bởi một hoặc nhiều việc thuộc nhóm bao gồm việc làm thay đổi trình tự của gen tăng cường ghép nối exon, làm thay đổi trình tự của gen làm câm ghép nối exon, bổ sung gen tăng cường ghép nối exon vào, và bổ sung gen làm câm ghép nối exon vào.
17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thư viện aptame được chia thành thư viện aptame nhỏ hơn trước khi đưa vào các catxet polynucleotit bao gồm các bước:
 - a. chuẩn bị thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa, trong đó các aptame trong thư viện này bao gồm các vùng ổn định 5' và 3' và một hoặc nhiều nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa,

- b. thực hiện PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa làm khuôn và đoạn mỗi thứ nhất và đoạn mỗi thứ hai mà là bổ trợ cho các vùng ổn định 5' và 3', mỗi đoạn mỗi bao gồm một trong số nhiều trình tự thẻ đánh dấu
 - c. phân lập các sản phẩm của PCR hai chu kỳ, và
 - d. khuếch đại theo phương pháp PCR phân nhóm bao gồm các sản phẩm đã được phân lập của PCR hai chu kỳ bằng cách sử dụng các đoạn mỗi bổ trợ cho phân nhóm bao gồm các trình tự thẻ đánh dấu ở đầu tận cùng 5' và 3'.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó đoạn mỗi thứ nhất hoặc thứ hai trong PCR hai chu kỳ chứa nhãn được chọn từ nhóm bao gồm biotin, digoxigenin (DIG), bromodeoxyuridin (BrdU), nhóm huỳnh quang, và nhóm hóa chất được dùng trong hóa học click.
19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thư viện công tắc ribo được chia thành một hoặc nhiều thư viện phụ công tắc ribo trước khi được đưa vào các tế bào nhân chuẩn.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thư viện công tắc ribo được chia tiếp thành các thư viện phụ bao gồm các bước:
- (a) đưa thư viện công tắc ribo vào vi khuẩn;
 - (b) gom các dòng vi khuẩn và chiết ADN của plasmit để thu được thư viện phụ công tắc ribo của plasmit để tạo ra một hoặc nhiều thư viện phụ sơ khai;
 - (c) một cách tùy ý, tạo ra thư viện phụ công tắc ribo thứ cấp từ thư viện phụ sơ khai gồm các công tắc ribo của plasmit bằng cách đưa thư viện phụ sơ khai vào vi khuẩn, gom các dòng vi khuẩn và phân lập ADN của plasmit.
21. Phương pháp chọn lọc phối tử mà liên kết với aptame ở tế bào nhân chuẩn bao gồm các bước:
- (a) chuẩn bị thư viện gồm các phối tử,
 - (b) chuẩn bị catxet polynucleotit để biểu hiện gen thông báo gián tiếp qua phối tử,
 - (c) đưa catxet polynucleotit vào tế bào nhân chuẩn in vitro,
 - (d) cho từng nhóm tế bào nhân chuẩn tiếp xúc với các thành viên của thư viện phối tử này, và

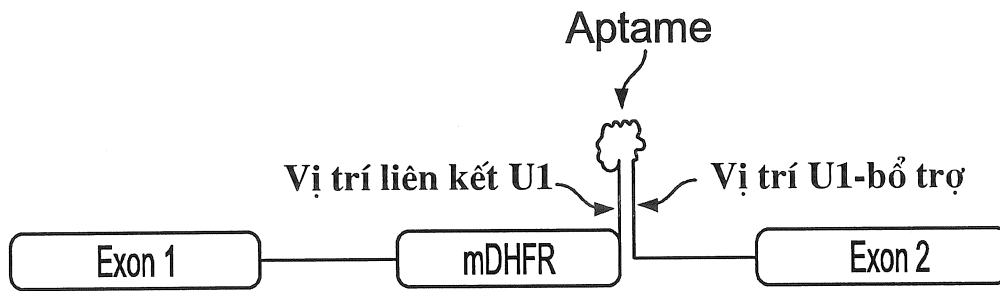
(e) đo mức độ biểu hiện của gen thông báo,

trong đó catxet polynucleotit chứa exon ghép nối theo cách khác, được bọc sườn bởi intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3', và công tắc ribo chứa (i) vùng tác động có thân mà bao gồm trình tự vị trí ghép nối 5' của intron ở đầu tận cùng 3', và (ii) aptame, trong đó exon ghép nối theo cách khác chứa codon dừng mà nằm trong cùng khung với gen thông báo khi exon ghép nối theo cách khác được ghép nối vào ARN thông tin của gen thông báo.

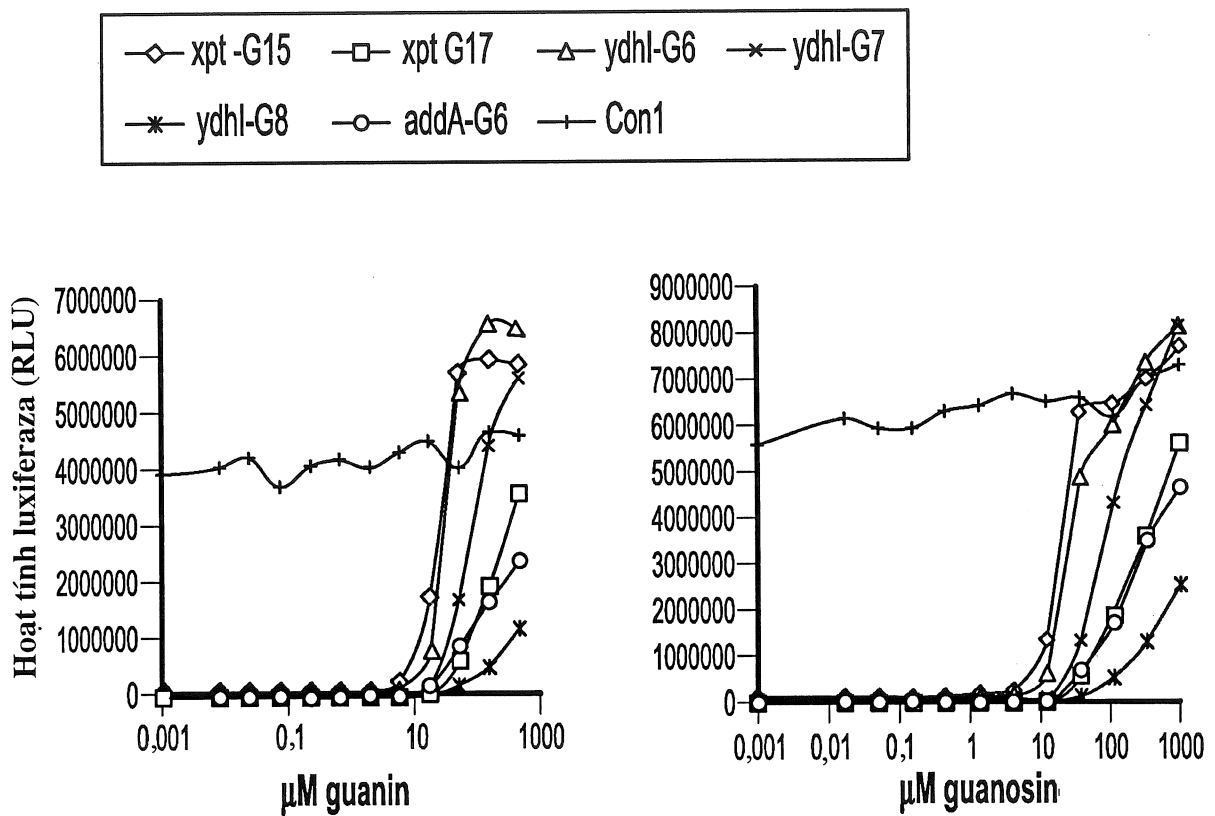
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó phối tử là phân tử nhỏ.
23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó phối tử là phân tử mà được tạo ra bởi tế bào nhân chuẩn.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó phối tử là chất chuyển hóa, axit nucleic, vitamin, đồng tác nhân, lipid, monosacarit, và thể mang thông tin thứ hai.
25. Phương pháp theo điểm 21, trong đó tế bào nhân chuẩn được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của động vật có vú, tế bào của côn trùng, tế bào thực vật, và tế bào nấm men.
26. Phương pháp theo điểm 21, trong đó gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm protein huỳnh quang, luxiferaza, β -galactosidaza và peroxidaza của cây củ cải cay.
27. Phương pháp theo điểm 21, trong đó gen thông báo được chọn từ nhóm bao gồm xytokin, phân tử phát tín hiệu, hormon sinh trưởng, kháng thể, ARN điều hòa, protein có hoạt tính điều trị, hoặc peptit.
28. Phương pháp theo điểm 21, trong đó mức độ biểu hiện của gen thông báo lớn hơn khoảng 10 lần khi phối tử liên kết một cách đặc hiệu với aptame so với mức độ biểu hiện của gen thông báo khi phối tử không có mặt.
29. Phương pháp theo điểm 21, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' có nguồn gốc từ intron 2 của gen β -globin của người.
30. Phương pháp theo điểm 21, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 50 nucleotit đến 300 nucleotit.
31. Phương pháp theo điểm 21, trong đó intron ở đầu tận cùng 5' và intron ở đầu tận cùng 3' độc lập có chiều dài khoảng từ 125 nucleotit đến 240 nucleotit.

32. Phương pháp theo điểm 21, trong đó thân của vùng tác động có chiều dài khoảng từ 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ.
33. Phương pháp theo điểm 21, trong đó thân của vùng tác động có chiều dài từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ.
34. Phương pháp theo điểm 21, trong đó exon ghép nối theo cách khác có nguồn gốc từ nhóm bao gồm exon 2 của gen dihydrofolat reductaza của người, exon 5 đột biến của khối u Wilms 1 của người, exon 16 của protein kinaza II delta phụ thuộc canxi/calmodulin của chuột, và SIRT1 exon 6.
35. Phương pháp theo điểm 21, trong đó exon ghép nối theo cách khác là exon 2 đã được cải biến từ DHFR của người.
36. Phương pháp theo điểm 21, trong đó exon ghép nối theo cách khác là loại tổng hợp.
37. Phương pháp theo điểm 21, trong đó exon ghép nối theo cách khác được cải biến bởi một hoặc nhiều việc thuộc nhóm bao gồm việc làm thay đổi trình tự của gen tăng cường ghép nối exon, làm thay đổi trình tự của gen làm câm ghép nối exon, bổ sung gen tăng cường ghép nối exon vào, và bổ sung gen làm câm ghép nối exon vào.
38. Aptame được mã hóa bởi trình tự chứa trình tự SEQ ID NO: 14 đến 27.
39. Aptame được mã hóa bởi trình tự chứa trình tự SEQ ID NO: 24.

1/17

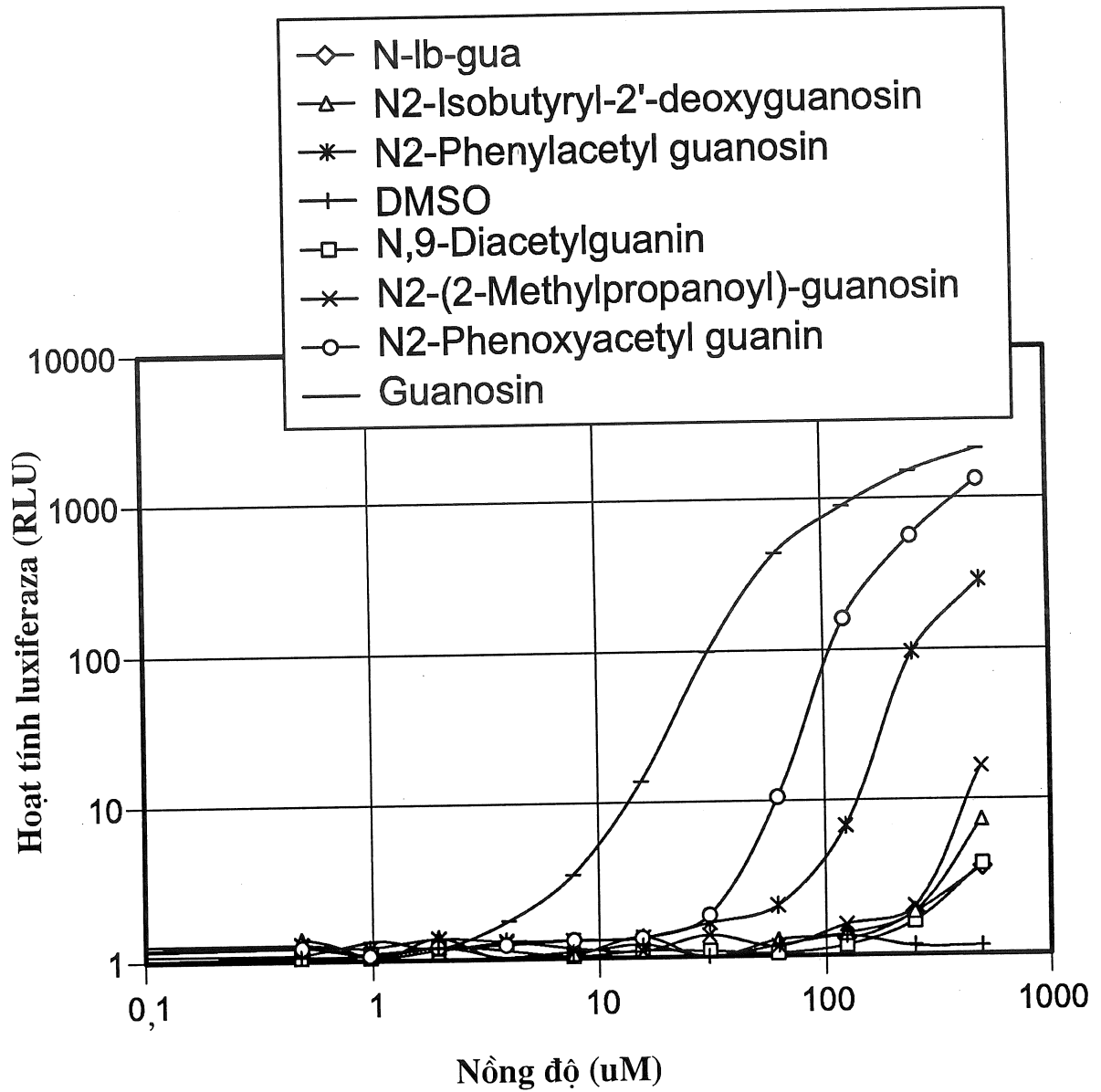


Hình 1a



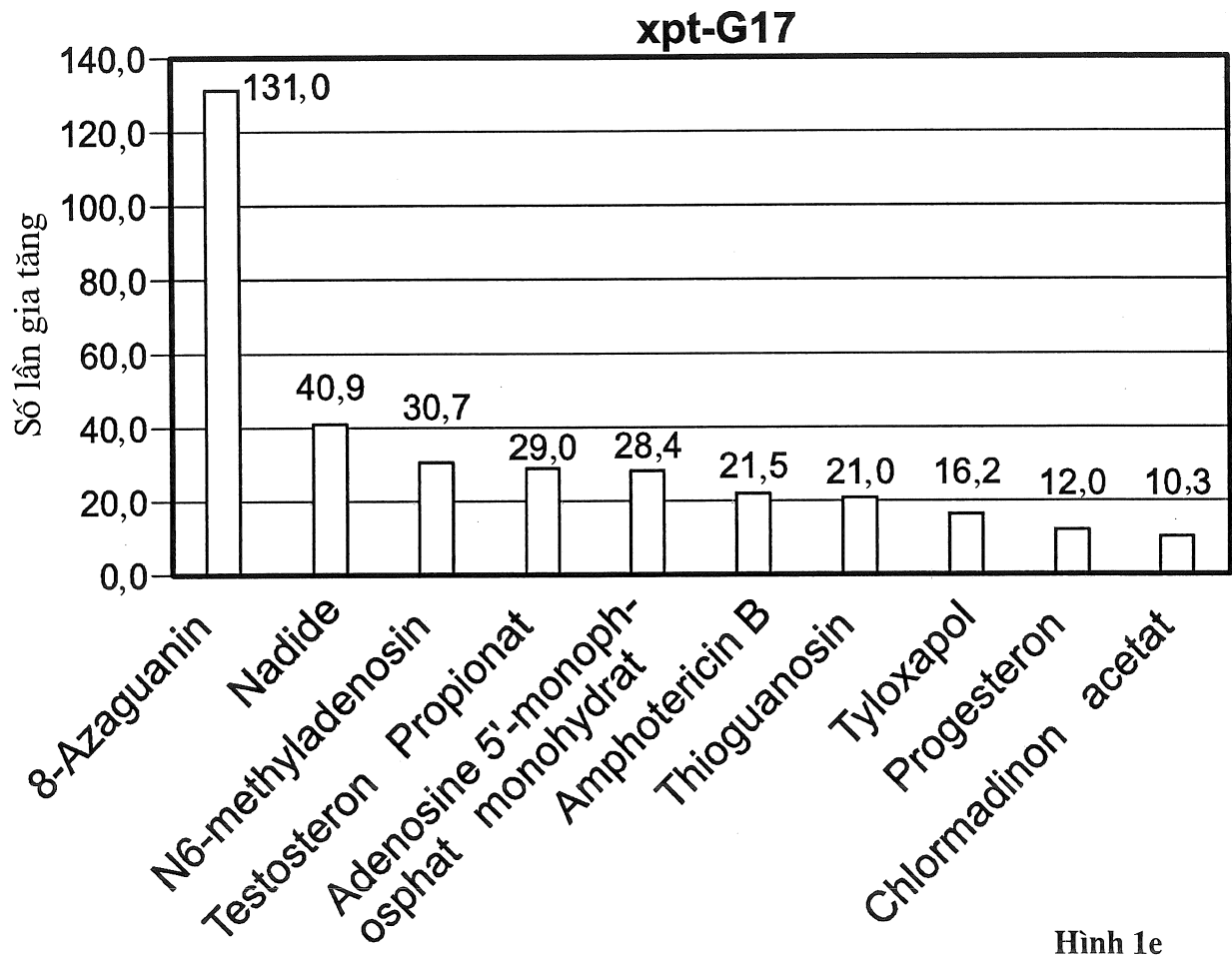
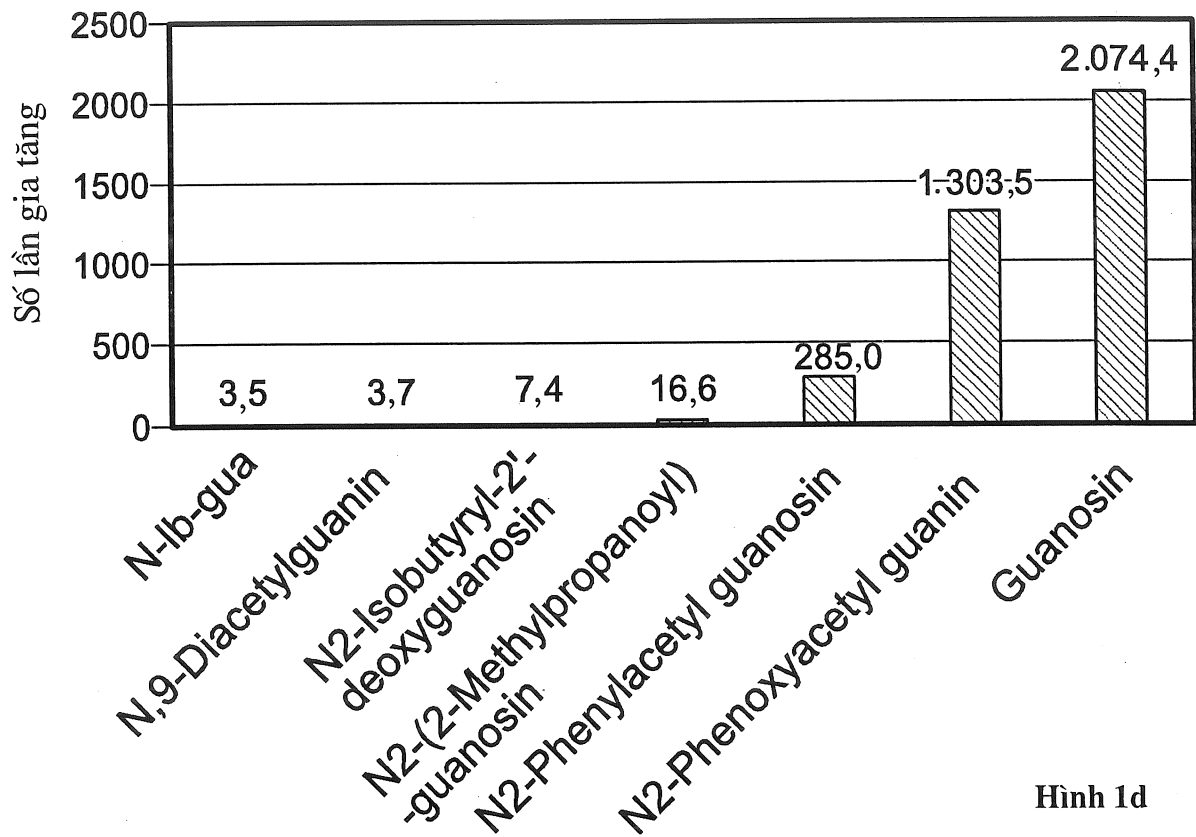
Hình 1b

2/17

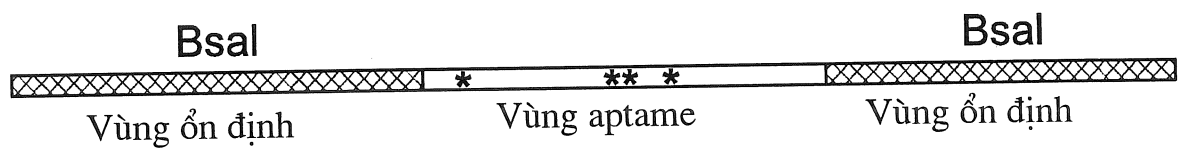


Hình 1c

3/17



4/17

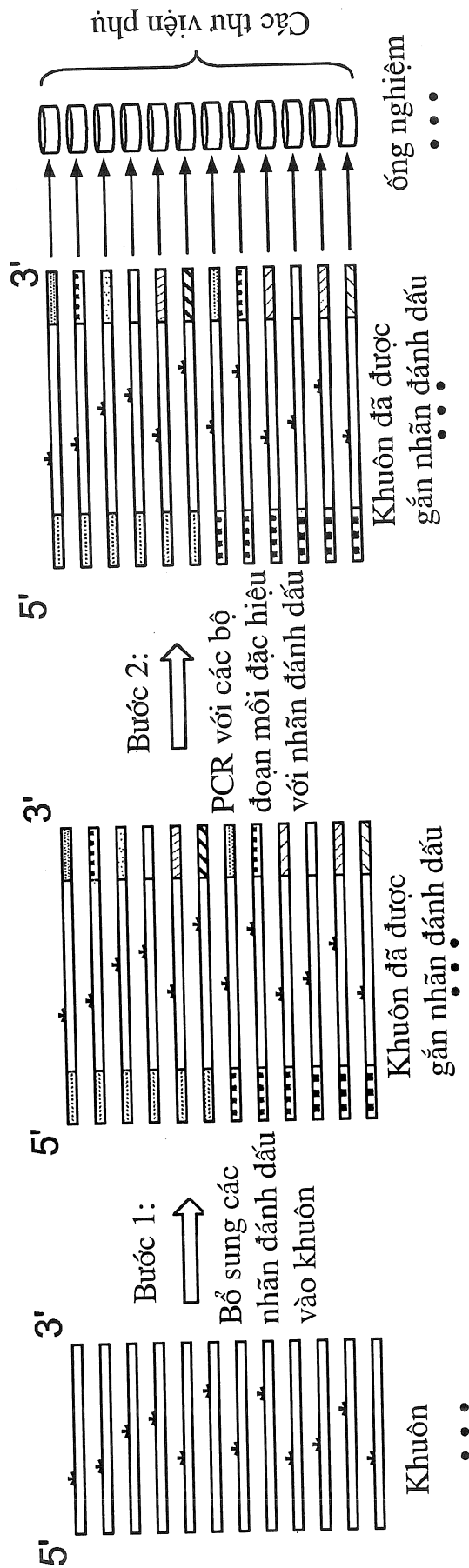


* biểu thị vùng đã được ngẫu nhiên hóa

Khuôn để tạo ra trình tự aptame đã được ngẫu nhiên hóa

Hình 2

5/17

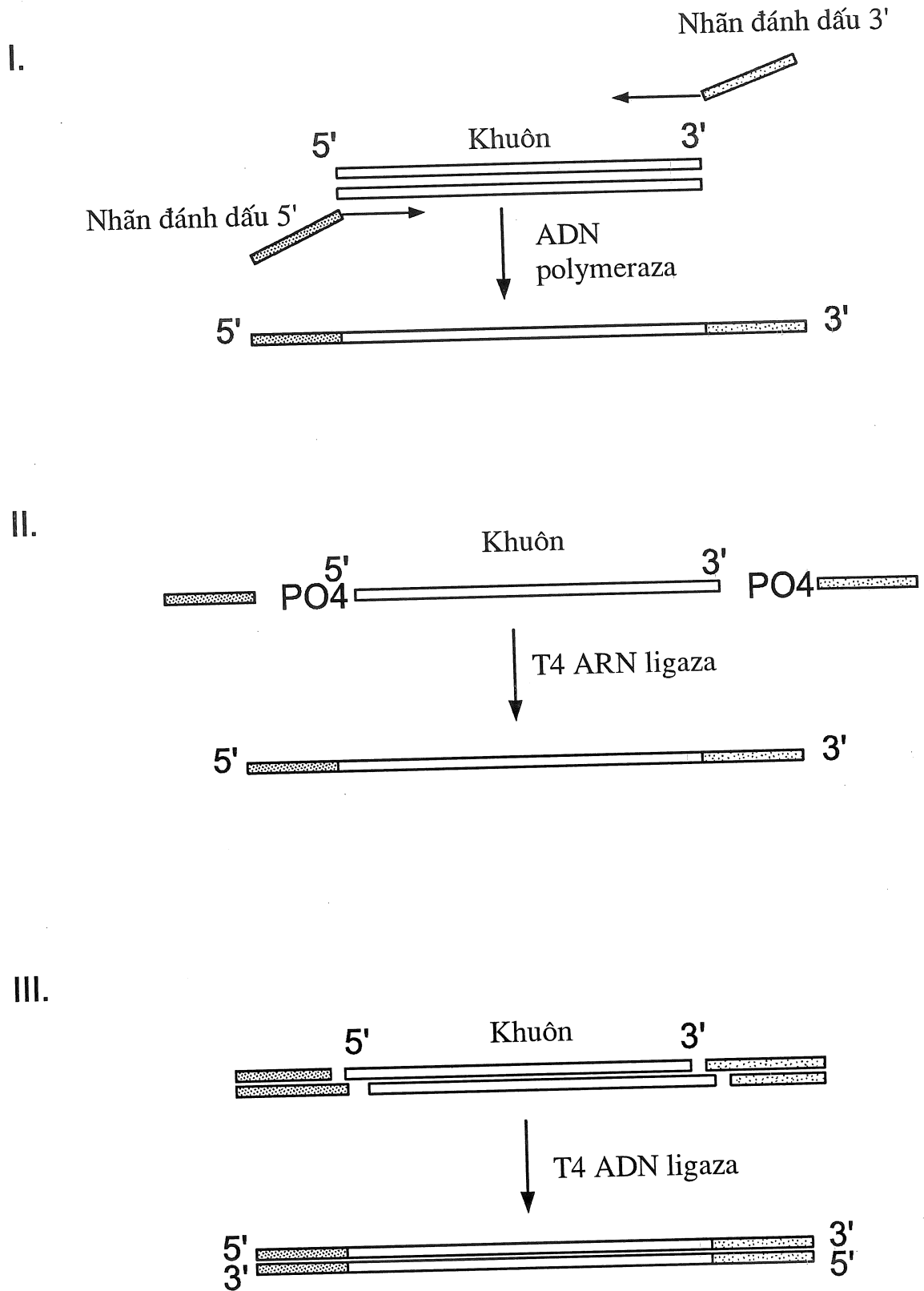


* biểu thị vùng đã được ngẫu nhiên hóa

Cách thức tách thư viện aptame đã được ngẫu nhiên hóa bằng cách giải trình tự gắn nhãn đánh dấu và khuếch đại theo phương pháp PCR

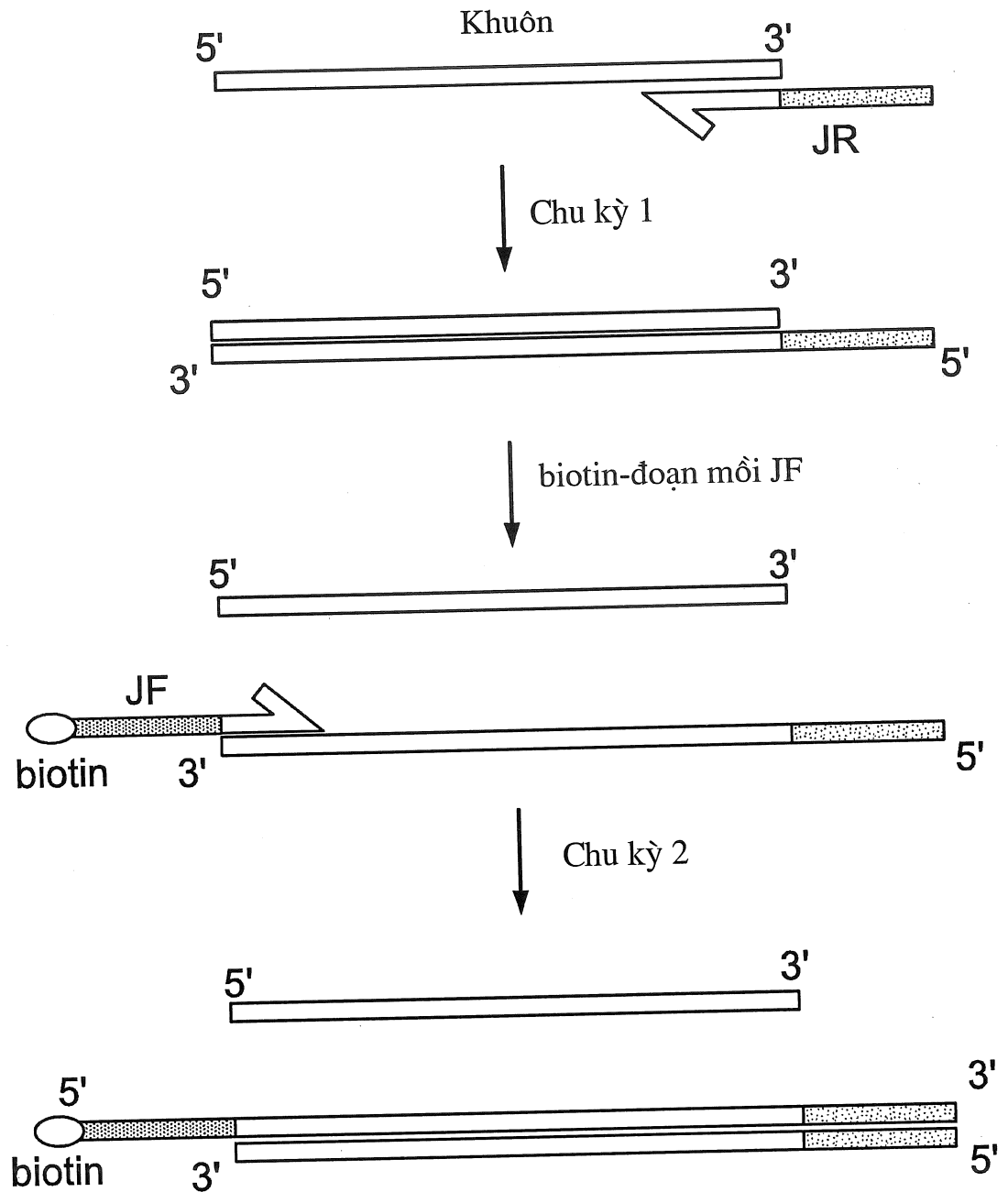
Hình 3a

6/17



Hình 3b

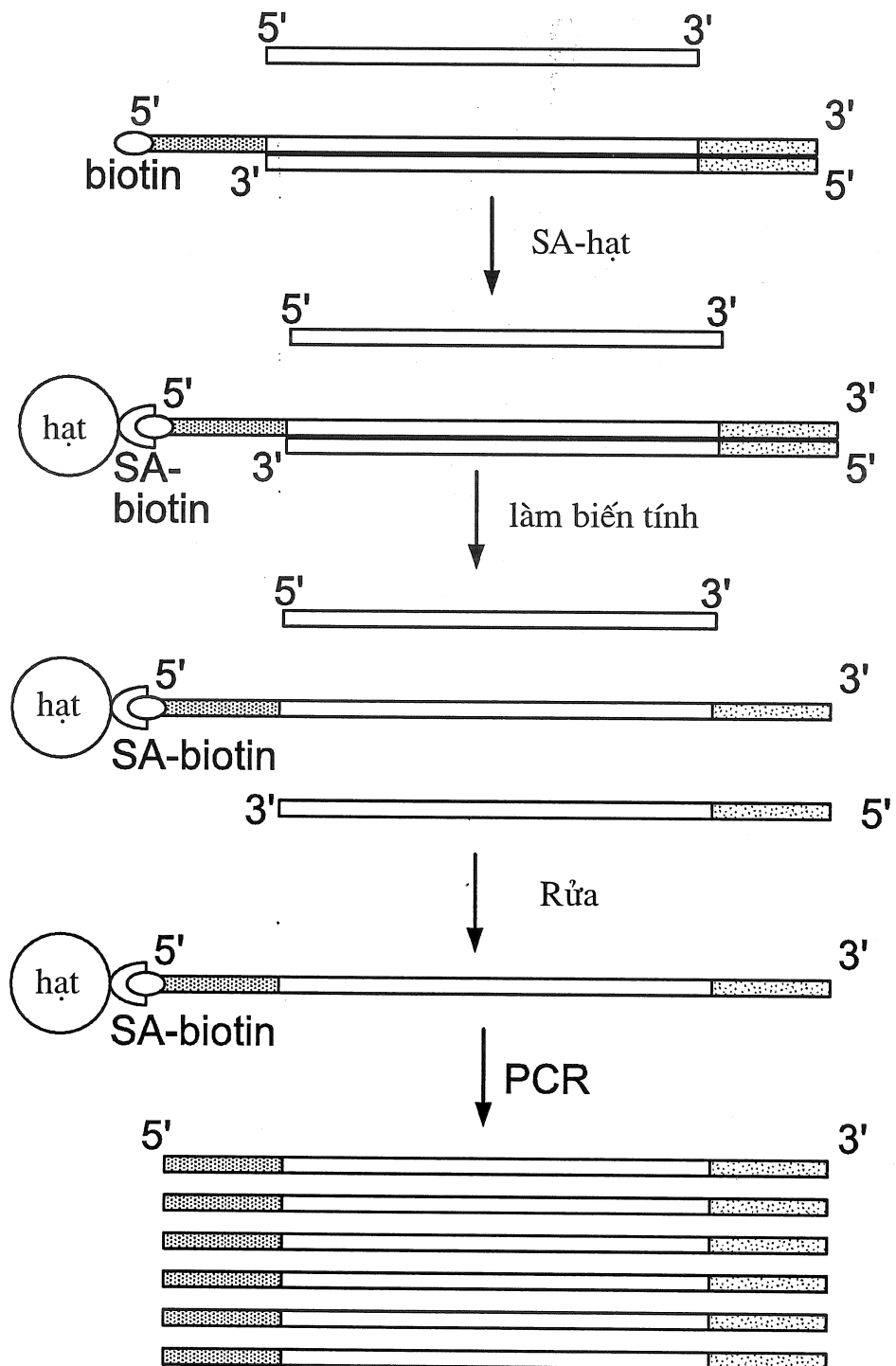
7/17



PCR hai chu kỳ để bổ sung nhãn đánh dấu trình tự vào

Hình 3c

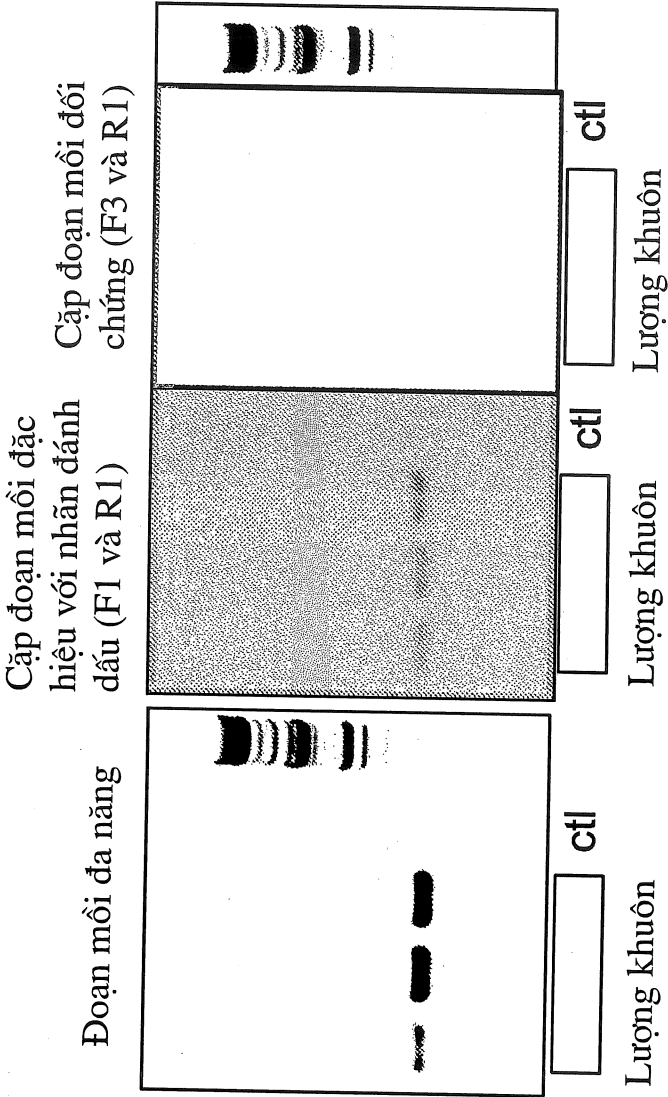
8/17



Khuôn đã được gắn nhãn đánh dấu

Tạo ra thư viện aptame đã được gắn nhãn đánh dấu

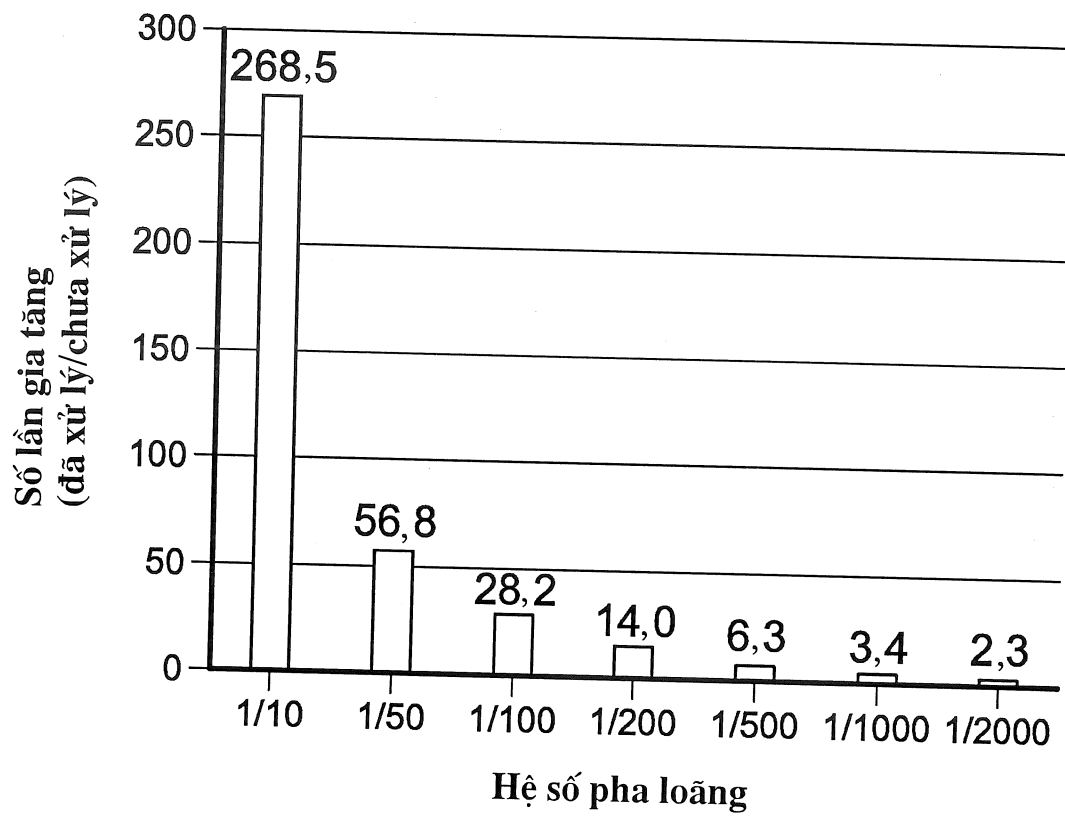
Hình 3d



Lượng khuôn từ trái sang phải : 1 bản sao, 2,3 bản sao và 4,6 bản sao

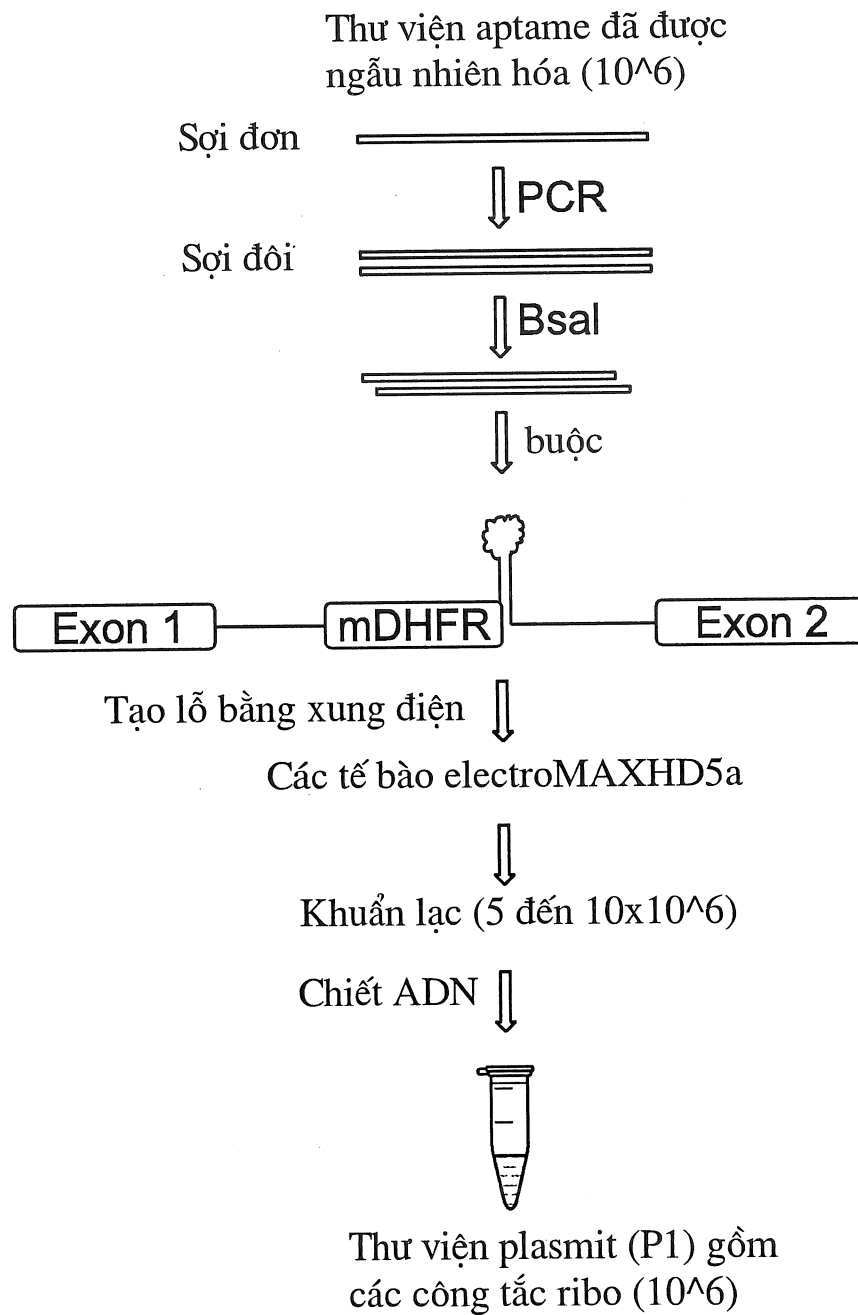
Hình 3e

10/17



Hình 4

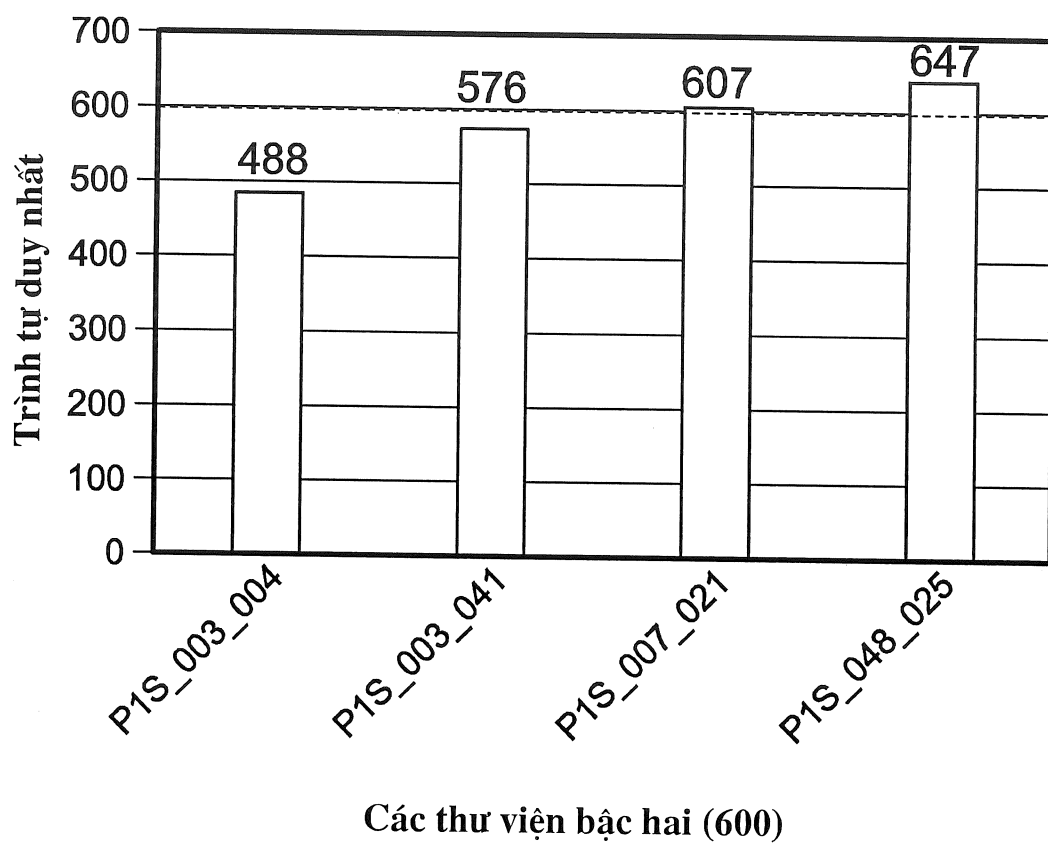
11/17



Hình 5a

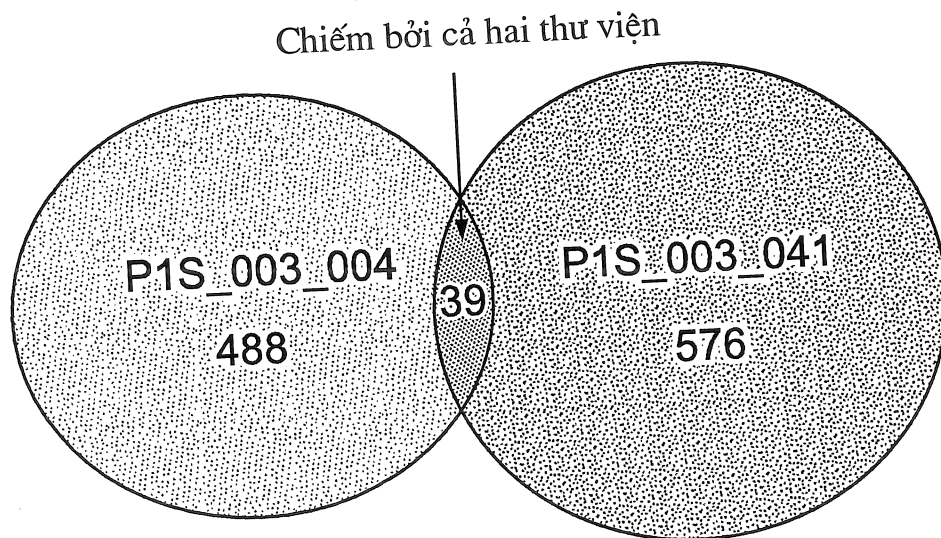


13/17

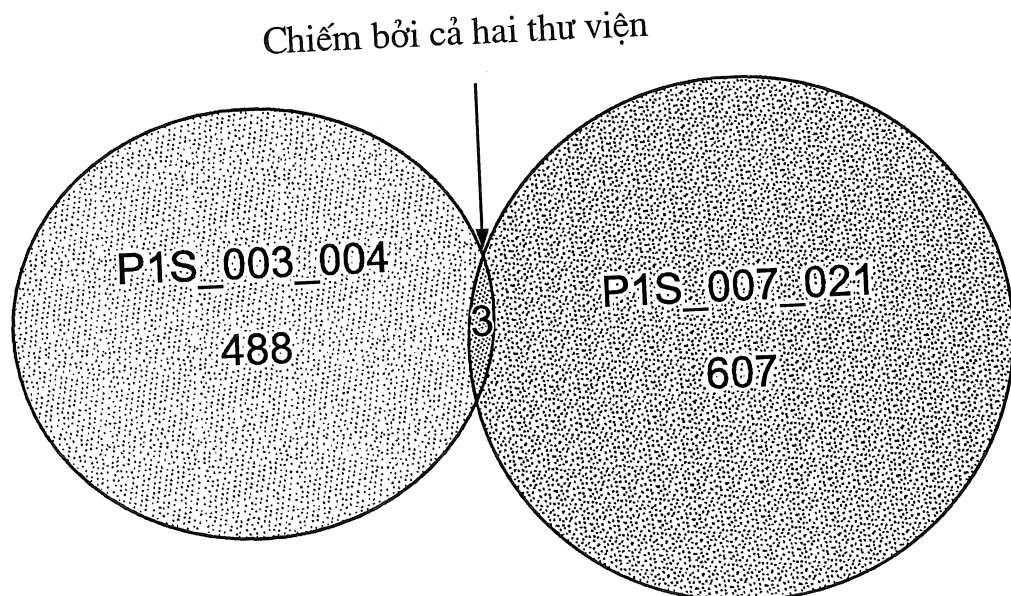


Hình 5c

14/17

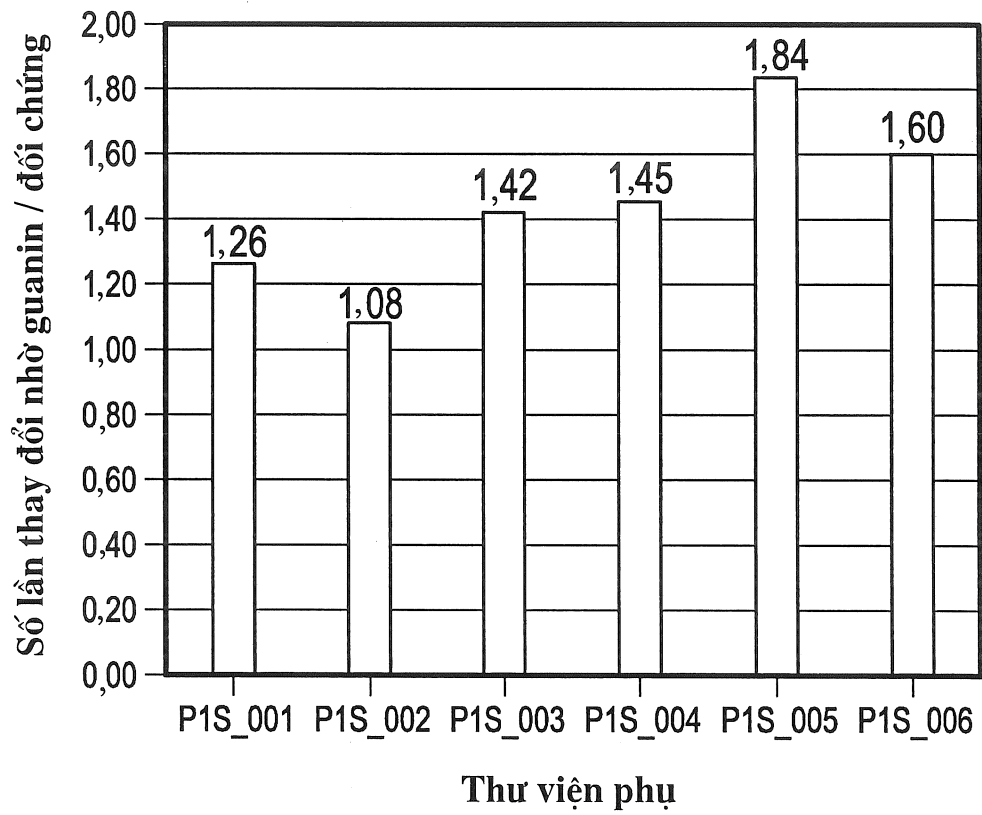


Hình 5d

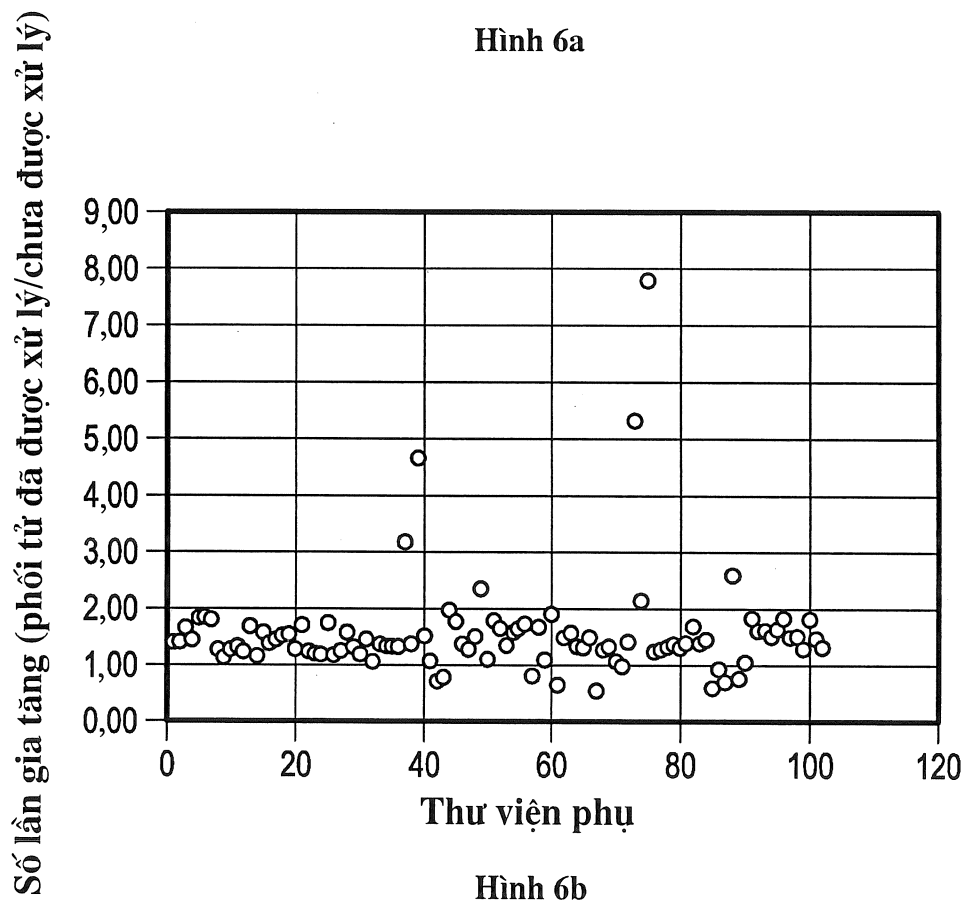


Hình 5e

15/17



Hình 6a

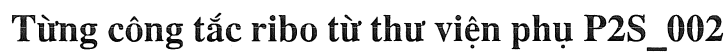


Hình 6b

Thư viện phụ P2S_002 (50 công tắc ribo)

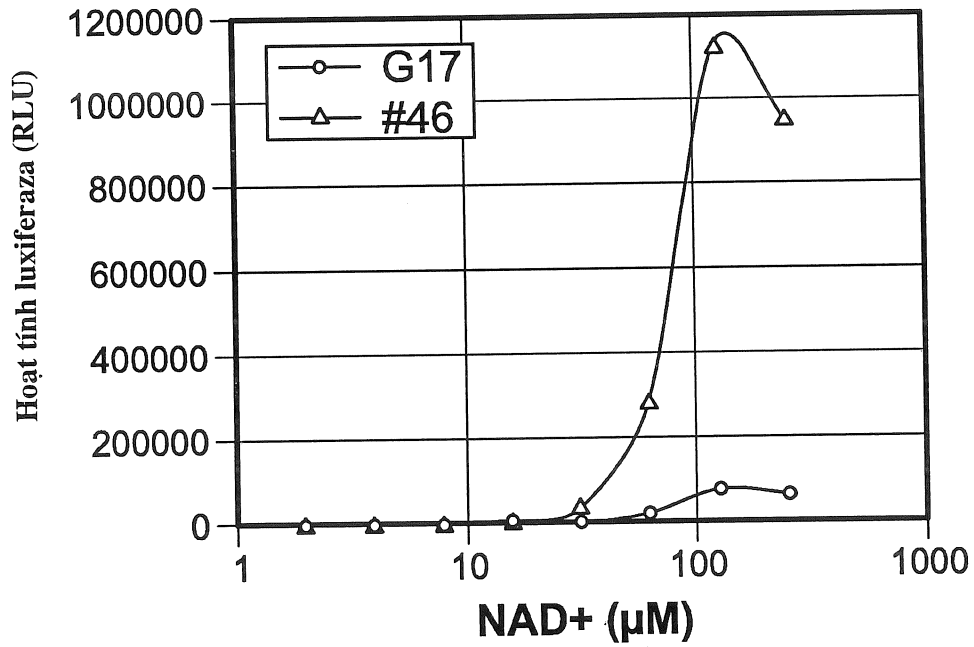


Hình 6c

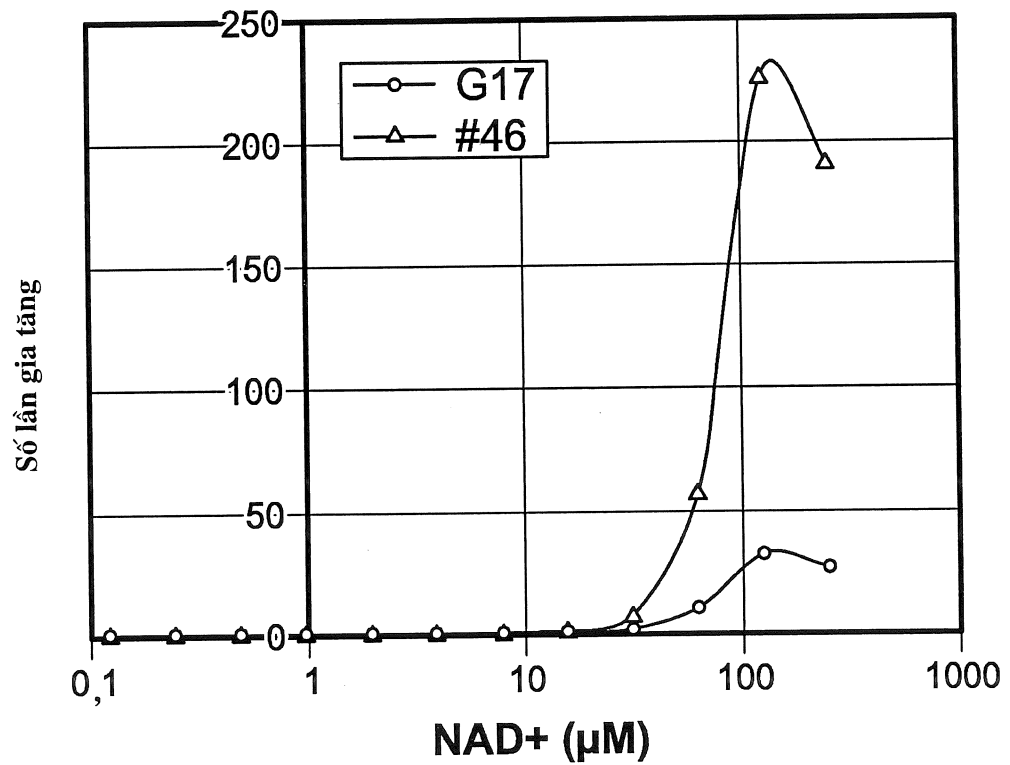


Hình 6d

17/17



Hình 6e



Hình 6f

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MeiraGTx UK II Limited
Guo, Xuecui
Forbes, Alexandria
Feng, Lei

<120> PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC APTAME, APTAME CHỌN LỌC ĐƯỢC THEO PHƯƠNG PHÁP
NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC PHỐI TỬ

<130> 162027.48476

<150> U.S. 62/370,599

<151> 2016-08-03

<160> 27

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 69

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> xpt-A8

<400> 1

gtaatgtata atcgcggtgga tatggcacgc aagtttctac cgggcaccgt aaatgtccga
60

ttacattac

69

<210> 2

<211> 73

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> add-G6

<400> 2

gtaatgtgta taatcctaata gatatggttt gggagtttct accaagagcc ttaaactctt
60

gactacacat tac

73

<210> 3

<211> 73

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> add-A6

<400> 3
gtaatgtgta taatcctaata gatatggttt gggagtttct accaagagcc ttaaactctt
60

gattacacat tac
73

<210> 4
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gdg6-A8

<400> 4
gtaatgtaca gggtagcata atgggctact gaccccgccg ggaaacctat ttcccgatta
60

cattac
66

<210> 5
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> gdg6-G8

<400> 5
gtaatgtaca gggtagcata atgggctact gaccccgccg ggaaacctat ttcccgacta
60

cattac
66

<210> 6
<211> 69
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Ydhl-G8

<400> 6
gtaatgtata acctcaataa tatgggtttga ggggtgtctac caggaaccgt aaaatcctga
60

ctacattac
69

<210> 7
<211> 73
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Ydh1-A6

<400> 7
gtaatgtgta taacctcaat aatatgggtt gaggggtgtct accaggaacc gtaaaatcct
60

gattacacat tac
73

<210> 8
<211> 75
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> yxj-A6

<400> 8
gtaatgtgta tatgatcagt aatatgggtct gattgtttct acctagtaac cgtaaaaaac
60

tagattacac attac
75

<210> 9
<211> 153
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tạo thư viện aptame

<220>
<221> dấu hiệu khác
<222> (57)..(59)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu khác

<222> (77)..(78)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu khác

<222> (80)..(83)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu khác

<222> (85)..(85)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 9

gacttcgggc tcattccagag aatgaaaaaa aaatcttcag tagaaggtaa tgtatannng
60

cgtggatatg gcacgcnnng nnncccgga caccgtaaat gtccgactac attacgcacc
120

attctaaaga ataacagtga agagaccaga cgg
153

<210> 10

<211> 153

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thư viện công tắc ribo của plasmit (P2)

<220>

<221> dấu hiệu khác

<222> (57)..(59)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu khác

<222> (77)..(78)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 10

gacttcgggc tcattccagag aatgaaaaaa aaatcttcag tagaaggtaa tgtatannng
60

cgtggatatg gcacgcnnng ttctaccggg caccgtaaat gtccgactac attacgcacc
120

attctaaaga ataacagtga agagaccaga cgg
153

<210> 11
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DHFR_F

<400> 11
gacttcgggc tcatccagag aatgaaaaaa aaatcttcag tagaaggtaa tg
52

<210> 12
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IVS_R

<400> 12
ccgtctgggc tcttcactgt tattcttttag aatgggtgcg
39

<210> 13
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> G17

<400> 13
gtataaatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tc
32

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #02 hộp điều chỉnh

<400> 14

gtataaccgc gtggatatgg cacgcggggtt tc
32

<210> 15
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #16 hộp điều chỉnh

<400> 15
gtatagccgc gtggatatgg cacgcggggtt tc
32

<210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #17 hộp tổng

<400> 16
gtataagggc gtggatatgg cacgctcggtt tc
32

<210> 17
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #21 hộp điều chỉnh

<400> 17
gtataaatgc gtggatatgg cacgcatggtt tc
32

<210> 18
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #26 hộp điều chỉnh

<400> 18

gtataagcgc gtggatatgg cacgcgcggtt tc
32

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #29 hộp điều chỉnh

<400> 19
gtatagtggc gtggatatgg cacgccagtt tc
32

<210> 20
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #31 hộp điều chỉnh

<400> 20
gtataaaggc gtggatatgg cacgccggtt tc
32

<210> 21
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #33 hộp điều chỉnh

<400> 21
gtatagttgc gtggatatgg cacgcaagtt tc
32

<210> 22
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #36 hộp điều chỉnh

<400> 22

gtatagcggc gtggatatgg cacgctgggtt tc
32

<210> 23
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #41 hộp điều chỉnh

<400> 23
gtataatggc gtggatatgg cacgctagtt tc
32

<210> 24
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #46 hộp điều chỉnh

<400> 24
gtataattgc gtggatatgg cacgcaagtt tc
32

<210> 25
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #54 hộp điều chỉnh

<400> 25
gtataattgc gtggatatgg cacgcgagtt tc
32

<210> 26
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #61 hộp điều chỉnh

<400> 26

gtataatcgc gtggatatgg cacgcgagtt tc
32

<210> 27
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> #69 hộp điều chỉnh

<400> 27
gtataactgc gtggatatgg cacgcgggtt tc
32