



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

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

(11)



1-0049475

(51)⁷ C12Q 1/70; C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2017-01544

(22) 29/10/2015

(86) PCT/KR2015/011478 29/10/2015

(87) WO 2016/072662 A1 12/05/2016

(30) 10-2014-0154488 07/11/2014 KR

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/10/2017 355A

(73) PANAGENE INC. (KR)

(Tamnip-dong) 54, Techno 10-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34027, Republic of Korea

(72) CHOI, Bo Ra (KR); KANG, Jae Hyun (KR); CHOI, Jae Jin (KR); KIM, Sung Kee (KR); PARK, Doo San (KR).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) HỖN HỢP CHẤT DÒ AXIT NUCLEIC PEPTIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN
KIỂU GEN CỦA VIRUT PAPILOMA Ở NGƯỜI

(21) 1-2017-01544

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp phát hiện HPV sử dụng chất dò phát hiện ANP. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chất dò phát hiện có khả năng gắn kết đặc hiệu kiểu gen với ADN của virus papilloma ở người (sau đây đề cập là “HPV”), kit phát hiện bao gồm chất dò, phương pháp phát hiện các kiểu gen HPV sử dụng chúng. Sáng chế có khả năng phát hiện chính xác 22 kiểu gen HPV được phát hiện trong cổ tử cung, chẩn đoán cùng nhiễm với một hoặc nhiều kiểu gen HPV, phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt kiểu gen HPV khác 22 kiểu gen, và phát hiện các kiểu gen HPV với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện kiểu gen của virus papiloma ở người (sau đây đề cập đến là “HPV”) sử dụng chất dò phát hiện axit nucleic peptit (ANP) chứa chất huỳnh quang và chất dập tắt. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đồng thời tại thời điểm thực tại nhiều kiểu gen HPV của virus papilloma ở người bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất dò phát hiện có khả năng gắn kết đặc hiệu kiểu gen với ADN của HPV, phân tích đường cong nóng chảy, và kit phân tích kiểu gen HPV bao gồm phân tích đường cong nóng chảy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus papilloma ở người (sau đây đề cập là “HPV”) có vòng ADN dạng sợi kép có kích thước 8 kb, mã hóa tám gen E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 và L2. HPV nhiễm vào tế bào biểu mô ở động vật có vú bao gồm người, và liên quan đến mụn cơm và nhiều khối u ác tính khác nhau. Thực tế, sự nhiễm HPV được báo cáo là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra ung thư cổ tử cung (xem Howley PM. Virology, 1996, 2:2045-2109).

Ung thư cổ tử cung là khối u ác tính ở cổ tử cung, và hình thành 95% ung thư tử cung. Ung thư vú được báo cáo là bệnh ung thư thường gặp nhất, và ung thư cổ tử cung là bệnh ung thư thường gặp thứ hai, trong số các bệnh ung thư ở phụ nữ trên toàn thế giới (Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2004). Thông thường, bệnh ung thư cổ tử cung bắt đầu do nhiễm HPV ở tế bào biểu mô nền của cổ tử cung, và sau đó tiến triển thành ung thư thâm nhập sau giai đoạn tiền khối u dài bao gồm tổn thương lớp biểu mô thùy thấp (low squamous intraepithelial lesion-LSIL), tổn thương lớp biểu mô thùy cao (high squamous intraepithelial lesion-HSIL) và sự tạo khối u

trong biểu mô. Vì ung thư cổ tử cung phát triển từng bước qua giai đoạn thời gian dài, nếu tổn thương tiền khối u trong giai đoạn trung gian của ung thư cổ tử cung được phát hiện hiệu quả, nó có thể được điều trị trước khi tiến triển thành ung thư thâm nhập, do đó có khả năng ngăn ngừa bệnh ung thư cổ tử cung. Do đó, rất quan trọng để chẩn đoán, phòng trừ và điều trị bệnh ung thư cổ tử cung để cung cấp phương pháp phát hiện hiệu quả HPV, mà là nguyên nhân gây bệnh ung thư cổ tử cung.

HPV kiểu gen được xác định phụ thuộc vào khung đọc mở của gen E6, E7 và L1, trong số trình tự hệ gen của HPV. Cho đến nay, hơn 120 kiểu gen khác nhau được xác định. Các kiểu gen này có thể được phân loại thành nhóm nguy cơ cao và nhóm nguy cơ thấp, phụ thuộc vào nguy cơ gây ra bệnh ung thư cổ tử cung. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 và 68, nằm trong nhóm nguy cơ cao, HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 44, 47, 53, 66 và 69, nằm trong nhóm nguy cơ thấp, và HPV 26, 73 và 82, nằm trong nhóm có tiềm năng nguy cơ cao, liên quan đến sự phát triển của bệnh ung thư cổ tử cung (xem Comparison of Seegene Anyplex II HPV 28 with the PGMY-CHUV Assay for Human papillomavirus Genotyping, C. Estrade *et al.*, *J Clin Microbiol*, 2014, 52(2): 607). Như được thể hiện ở đây, kiểu gen của HPV bị nhiễm ảnh hưởng đáng kể đến sự tiến triển bệnh ung thư. Do đó, sự phát hiện sự có mặt của HPV trong mẫu và kiểu gen của nó quan trọng để dự báo và chẩn đoán bệnh ung thư cổ tử cung.

Phương pháp phát hiện sự có mặt của HPV và kiểu gen của nó thường được phân loại thành xét nghiệm papanicolaou smear (hoặc pap smear), xác định trực tiếp ADN của HPV, và các phương pháp này bao gồm khuếch đại ADN của HPV. Pap smear dùng để sàng lọc sơ bộ ung thư cổ tử cung và tổn thương tiền sản trên cơ sở hình thái học tế bào của pap smear. Phương pháp được thực hiện dưới dạng thử nghiệm tiêu chuẩn từ năm 1940, và được sử dụng cho đến nay để chẩn đoán HPV. Tuy nhiên, độ chính xác của thử nghiệm dựa vào kỹ năng của người làm thử nghiệm, và được báo cáo có tỷ lệ âm tính giả cao 30-40% (xem Ledger WJ *et al.*, *Am J Obstet Gynecol*,

2000, 182: 860-865).

Xác định trực tiếp ADN HPV bao gồm lai chất lỏng (Hybrid Capture by Digene Diagnostics, Silver Spring, MD), southern blot và dot blot sử dụng chất dò đặc hiệu loại HPV, và sàng lọc lai hóa tại chỗ (filter in situ hybridization-FISH) (xem Detection of high-risk HPV type by the hybrid Capture 2 test, George *et al.*, *J Clin Microbiol*, 2001, 65:155-162). Tuy nhiên, các phương pháp có nhược điểm là độ nhạy thử nghiệm thấp vì chúng không bao gồm bước khuếch đại ADN của HPV.

Phương pháp sử dụng sự khuếch đại ADN HPV bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza đặc hiệu và PCR dùng đoạn môi chung. Cụ thể là, sàng lọc kiểu gen thường được tiến hành bằng lai dot blot, lai khay vi片片, thử nghiệm đường chất dò (xem Evaluation of a Modified Reverse Line Blot Assay for Detection and Typing of Human Papillomavirus, Feray *et al.*, 2005, *Am J clin Pathol.* 123:896-899) hoặc tương tự từ ADN HPV được khuếch đại bằng bộ đoạn môi chung (see Leen-Jan *et al.*, *J Clin Microbiol*, 2006, 3292-3298]. Tuy nhiên, các phương pháp này bao gồm các quy trình phức tạp, tốn nhiều thời gian và công lao động vì số lượng mẫu phải xử lý và phân tích, và có độ nhạy phát hiện thấp và khó khăn trong phân tích dữ liệu [xem Gravitt PE *et al.*, *J Clin Microbiol*, 1998, 36:3020-3027].

Gần đây, kit phát hiện kiểu gen HPV được phát triển căn cứ vào công nghệ vi dây ADN (chip ADN) (xem Patent Hàn Quốc mở số 2006-0015669 và 2004-0078506). Kit có chất dò ADN đặc hiệu với nhiều kiểu gen HPV được cố định trên片片 kính, và có thể đồng thời phát hiện phản ứng lai của chúng với sản phẩm PCR được khuếch đại. Vì chip ADN HPV có thể phát hiện nhanh nhiều kiểu gen HPV trong thời gian ngắn, nó đã được sử dụng thương mại rộng rãi để chẩn đoán HPV.

Ngoài ra, phương pháp chẩn đoán HPV sử dụng vi dây hạt gần đây được phát triển. Phương pháp bao gồm cố định chất dò đặc hiệu kiểu gen HPV lên các hạt và việc lai chúng với axit nucleic đích trong một ống. Vì kiểu gen HPV được phát hiện

bằng cách chọn lọc hạt có chất dò được lai với axit nucleic, một số mẫu có thể được xử lý trong thời gian ngắn hơn so với chip ADN thông thường mà có chất dò được cố định trên phiến kính hoặc tương tự. Ngoài ra, phương pháp rất hữu ích trong thương mại, bởi vì nó có khả năng phát hiện kiểu gen HPV với sự đặc hiệu tăng và chi phí giảm (xem Facile, comprehensive, High-Throughput Genotyping of Human Genital Papillomaviruses using spectrally addressable Liquid Bead Microarrays, Jan Wallace *et al.*, 2005, *J. Mol. Diagn.*, 7: 72-80 và Bead-based multiplex genotyping of Human Papillomaviruses, Markus *et al.*, 2006, *J. Clin. Microbiol.*, 44: 504-512). Phương pháp quang học sử dụng chất huỳnh quang mà phát huỳnh quang với bước sóng đặc hiệu mà được sử dụng chung để xác nhận liệu sự lai ADN/ADN có xuất hiện giữa ADN của kiểu gen đặc hiệu và chất dò ADN được cố định. Ngoài ra, phương pháp đã biết khác như phương pháp hóa điện có thể cũng được sử dụng. Tuy nhiên, chip ADN hoặc chuỗi hạt có tính ổn định thấp vì tính ổn định sinh học hoặc hóa học của chính chất dò ADN được cố định thấp với các nucleaza, v.v, và nên có thể có ADN biến tính và hoạt tính giảm sau thời gian dài bảo quản (xem Korean Patent Laid-Open No. 2006-0091708).

Để vượt qua tính không ổn định của chính ADN, nhiều thể tương tự ADN đã được phát triển. Trong số đó, ANP (axit nucleic peptit-peptide axit nucleics) được phát triển bởi Nielsen vào 1991. Trong PNA, liên kết phosphodiester của ADN được thay thế bằng liên kết peptit. Vì ANP có adenin, tymin, guanin và xytosin tương tự ADN, nó có thể thực hiện lai đặc hiệu bazơ với ADN hoặc ARN. Cụ thể là, sự khác nhau của nó trong cấu trúc của mạch chính, mà được thay đổi bằng liên kết peptit, thay đổi đặc tính anion của trục phosphat của ADN hoặc ARN thành trung tính. Việc loại bỏ lực đẩy tĩnh điện giữa các anion tạo ra từ sự trung hòa đặc tính anion trực tiếp góp phần gia tăng khả năng liên kết khi lai hóa. Kết quả là, tăng tỷ lệ lai và tính đặc hiệu, và do đó cải thiện tỷ lệ S/N (signal to noise-tín hiệu so với nhiễu). Ngoài ra, ANP ổn định hơn

so với ADN hoặc ARN bởi vì enzym thoái biến sinh học như nucleaza không thể nhận diện ANP (xem Peptide nucleic acid, PNA, sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamua, P.E. Nielsen *et al.*, 1991, *Science*, 254, 1497-1500).

Như mô tả ở trên, ANP, mà có khả năng lai và tính ổn định cao trong khi duy trì chức năng của ADN hoặc ARN, được nhận diện là yếu tố thay đổi hứa hẹn cho ADN mà có thể bù vào những hạn chế của ADN. Do đó, nghiên cứu rộng rãi đã được tiến hành để phân tích hoặc chẩn đoán bằng oligome ANP tại vị trí của oligome ADN (Patent Hàn Quốc số 91708 và 12544 và tham khảo: [Peptide axit nucleics on microarrays and other biosensors, Brandt O *et al.*, 2004, *Trends in Biotechnology*, 22, 617-622], [Detection of target DNA using fluorescent cationic polymer and peptide axit nucleic probes on solid support, Fredric R Raymond *et al.*, 2005, *BMC technology*, 5, 1-5]).

Ví dụ, các tác giả sáng chế đã nộp đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Hàn Quốc số 10-2007-0022201, mà đề cập đến chip ANP và phương pháp phát hiện kiểu gen HPV bằng cách sử dụng chất dò có tính ổn định và khả năng gắn kết lai tuyệt vời. Tuy nhiên, thậm chí thông qua chip ANP có ưu điểm về sự phát hiện chính xác kiểu gen HPV với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, do tính tiện lợi cho người sử dụng của nó và thời gian phản ứng dài, nên tăng nhu cầu phát hiện kiểu gen HPV bằng real-time PCR.

Để giải quyết vấn đề trên, phương pháp kiểm tra cần thiết mà có khả năng phân tích nhiều mẫu chính xác trong giai đoạn thời gian ngắn với ít nhân công. Có thể nói rằng, trong số các công nghệ hiện có, một trong số chúng đáp ứng các điều kiện nhất là realtime PCR. Real-time PCR, mà theo dõi sự tăng sản phẩm PCR được khuếch đại theo thời điểm thực trong mọi chu kỳ, là công nghệ phân tích dùng để phát hiện chất huỳnh quang phản ứng với sản phẩm PCR được khuếch đại và định lượng. Khi so sánh

với PCR thông thường mà việc nhuộm màu trên gel sau bước cuối cùng và sản phẩm PCR được khuếch đại được quan sát sau khi điện di, phương pháp này không có thêm các hoạt động phụ của điện di và có tính chính xác và độ nhạy tuyệt vời và khả năng tái lập cao. Ngoài ra, nó là phương pháp chẩn đoán mà có thể tiến hành tự động và có khả năng định lượng. Nó có tính ổn định sinh học tuyệt vời chống lại sự nhiễm tạp chất từ chất nhuộm như EtBr (Ethidium Bromua) và tia cực tím và cho phép xác định tự động sự có mặt hoặc không có việc khuếch đại gen đặc hiệu và định lượng chính xác ADN và ARN được phát hiện (xem Real-time PCR in virology, Mackay I.M., Arden K.E. and Nitsche A., 2002, *Axit nucleics Res.* 30(6): 1292-1305).

Tuy nhiên, real-time PCR như trên, chỉ các kiểu gen 16 và 18 có thể được phát hiện do sự khác nhau trong thiết kế chất huỳnh quang, và chỉ đến bốn kiểu gen có thể được xác định trong một ống vì các kiểu gen được phát hiện chỉ dựa trên chất huỳnh quang. Nỗ lực liên tục được tạo ra để phát hiện nhiều biến thể gen khác nhau trong ống, và việc phân tích đường cong nóng chảy sử dụng chất dò ADN có thể được sử dụng. Chất dò ADN được sử dụng để phân tích đường cong nóng chảy bao gồm chất dò MGB Taqman, tín hiệu phân tử (molecular beacon-MB), và chất dò đôi. Các phương pháp này có ưu điểm là chúng có khả năng xác định biến thể nucleotit đơn nhưng có hạn chế là chiều dài tối thiểu của chất dò ADN là 20-40mer, độ dài này dài, làm khó khăn để phát hiện các biến thể nucleotit đơn mà gần nhau trong một phản ứng (xem Hidefumi Sasaki *et al.*, 2005, *Clin Cancer Res.* 11: 2924-2929, Manna Zhang *et al.*, 2002, *HEPATOLOGY* 36: 3).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề nêu trên của tình trạng kỹ thuật, các tác giả của sáng chế đã tạo ra chất dò ANP mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với từng kiểu gen HPV sử dụng ANP có ưu điểm đã đề cập trên. Chất dò ANP phát hiện kiểu gen HPV bao gồm chất dò có thể phát hiện 20 kiểu gen ở nhóm có nguy cơ cao (các loại 16, 18, 26, 31,

33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73 và 82 trong nhóm có nguy cơ cao), hai kiểu gen trong nhóm có nguy cơ thấp (loại 6 và 11 trong nhóm có nguy cơ thấp), và 18 kiểu gen khác mà thường được phát hiện ở người Hàn Quốc (các loại 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90). Ngoài ra, chất dò dương tính HPV mà có thể lai được với vùng liên ứng của kiểu gen HPV được tạo ra để xác nhận sự nhiễm HPV.

Sử dụng chất dò PNA, kit phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực được sản xuất. Ngoài ra, sử dụng chế phẩm đoạn môi liên ứng HPV mà có khả năng tăng độ nhạy khuếch đại của HPV, các tác giả đã xác nhận được rằng mỗi kiểu gen có thể được phát hiện với tính đặc hiệu và độ nhạy cao, và do đó hoàn thiện sáng chế này.

Mục đích của sáng chế là đề xuất chất dò ANP mà có khả năng phát hiện chính xác kiểu gen HPV với độ đặc hiệu và tính nhạy cao và có tính ổn định chống lại enzym thoái biến sinh học. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kit phát hiện dùng để phát hiện kiểu gen HPV chứa chất dò. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phát hiện kiểu gen HPV sử dụng kit phát hiện này.

ANP, có đặc tính tuyệt vời khi so với ADN, về tính ổn định nhiệt và sinh học và trong xác nhận và khả năng gắn kết với ADN đích, có thể được sử dụng làm chất dò dùng cho real-time PCR để phát hiện biến thể nucleotit đơn. Tuy nhiên, real-time PCR sử dụng chất huỳnh quang để phát hiện ADN đích trong mẫu, và do đó, để phát hiện nhiều kiểu gen khác nhau, các chất dò mà có hai chiều dài bước sóng khác nhau là cần thiết. Vấn đề này là trở ngại chính cho phát hiện đa thành phần. Theo sáng chế, vấn đề này không thể được giải quyết bằng cách phân tích đường cong nóng chảy của chất dò huỳnh quang.

Sáng chế đề xuất chất dò ANP mà liên kết chất chỉ thị và chất dập tắt dùng để phát hiện từng trong số 22 kiểu gen HPV. Ngoài ra, đề xuất chất dò ANP mà liên kết với chất chỉ thị và chất dập tắt dùng để phát hiện các kiểu gen HPV khác 22 kiểu gen

HPV.

Sáng chế đề xuất phương pháp phân tích đường cong nóng chảy sử dụng chất dò ANP mà liên kết với chất chỉ thị và chất dập tắt dùng để phát hiện các kiểu gen HPV.

Sáng chế đề xuất kit dùng để phát hiện các kiểu gen HPV bao gồm chất dò ANP của HPV.

Chất dò ANP được sử dụng trong phân tích đường cong nóng chảy dùng để phát hiện các kiểu gen HPV có thể là chất dò chung hoặc có phân tử tích điện âm. Khi chất dò ANP tích điện âm được sử dụng, độ phân giải của đường cong nóng chảy tăng, làm cho dễ phân tích các kiểu gen khác nhau trong ống phản ứng một lần.

Ngoài ra, chất dò ANP có thể bao gồm chất huỳnh quang. Chất huỳnh quang có thể là chất chỉ thị, chất dập tắt và chất huỳnh quang xen vào.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện HPV, có khả năng để đồng thời phân tích đường cong khuếch đại thời gian thực và đường cong nóng chảy đối với 20 kiểu gen HPV trong nhóm nguy cơ cao và hai kiểu gen HPV trong nhóm nguy cơ thấp, mà cho phép xác định đa thành phần chính xác các kiểu gen HPV. Ngoài ra, có khả năng phát hiện các kiểu gen HPV khác 22 loại mà có thể được xác định và xác nhận sự có hoặc không nhiễm HPV. Ngoài ra, vì mỗi kiểu gen có thể được phát hiện với độ đặc hiệu và tính nhạy cao, phương pháp có thể khá hữu ích để xác định các kiểu gen HPV.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Mục 1) của Fig. 1 là sơ đồ thể hiện chất dò phát hiện đa thành phần và hỗn hợp đoạn mồi đặc hiệu loại HPV. Mục 2) của Fig. 1 là sơ đồ thể hiện hỗn hợp đoạn mồi sử dụng chất dò phát hiện ANP SYBR green hoặc huỳnh quang dùng để xác định sự nhiễm HPV và các loại khác. Mục 3) của Fig. 1 là sơ đồ thể hiện phức mồi sử dụng chất dò huỳnh quang ANP dùng để xác định 18 kiểu gen HPV (30, 32, 34, 40, 42, 43,

44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90) khác 22 kiểu gen HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73 và 82).

Fig. 2 là dữ liệu thể hiện độ nhạy phát hiện và các đỉnh nóng chảy của các kiểu gen HPV bằng cách sử dụng hỗn hợp chất dò phát hiện PNA huỳnh quang và các cặp mồi. Độ nhạy phát hiện đặc hiệu các kiểu gen HPV được xác định bằng cách sử dụng hỗn hợp chất dò ANP huỳnh quang đối với HPV để phát hiện được và hỗn hợp mồi đặc hiệu loại HPV. Bằng cách phân tích đỉnh nóng chảy của từng chất dò huỳnh quang, có khả năng phát hiện chất có một bản sao trong ADN của HPV, và đã xác nhận, bằng cách sử dụng giá trị T_m của chất huỳnh quang được đánh dấu là chất dò phát hiện, mà từng kiểu gen được xác định đặc hiệu.

Trong Fig. 3, mà bao gồm hỗn hợp chất dò phát hiện ANP huỳnh quang và các cặp mồi, đã xác nhận rằng các kiểu gen HPV được xác định bằng chất huỳnh quang và giá trị T_m . Đã xác nhận rằng, bằng cách đánh dấu từng chất huỳnh quang (FAM, HEX, ROX, CY5) lên 11 loại ANP, kiểu gen được xác định bằng T_m . Đã xác nhận rằng hỗn hợp ANP tương ứng được đánh dấu bằng chất huỳnh quang, FAM có thể xác định các kiểu gen 33, 11 và 58 và có T_m là 47,0°C, 58,5°C và 66,0°C. Ngoài ra, đã xác nhận rằng hỗn hợp ANP tương ứng được đánh dấu bằng chất huỳnh quang HEX có thể xác định các kiểu gen 16 và 73 và có T_m chất dò là 48,0°C và 63°C. Đã xác nhận rằng hỗn hợp ANP tương ứng được đánh dấu bằng chất huỳnh quang ROX có thể xác định kiểu gen 45, 18 và 69 và có T_m là 47,5°C, 59,5°C và 69,0°C. Đã xác nhận rằng hỗn hợp ANP tương ứng được đánh dấu bằng chất huỳnh quang CY5 có thể xác định các kiểu gen 26, 6 và 52 và T_m được phát hiện ở 44,0°C, 53,0°C, 62,5°C.

Trong Fig. 4, sàng lọc nhiễm HPV được tiến hành bằng cách phân tích biểu đồ Ct (ngưỡng chu kỳ) thu được bằng real-time PCR bằng cách sử dụng SYBR để xác định có nhiễm HPV hay không, và đã xác nhận rằng có khả năng kiểm tra tính đặc hiệu của việc khuếch đại gen HPV bằng cách phân tích các đỉnh nóng chảy. Ngoài ra, đã xác

nhận rằng hệ thống phát hiện chất dò huỳnh quang nhằm xác định việc có hay không có sự nhiễm HPV có khả năng phát hiện sự có mặt hay không có việc nhiễm ADN của HPV và kiểm tra tính đặc hiệu thông qua phân tích các biểu đồ Ct và các đỉnh nóng chảy.

Trong Fig. 5, đã xác nhận rằng có khả năng phát hiện các kiểu gen HPV thông qua phân tích các biểu đồ Ct thu được từ real-time PCR bằng cách sử dụng chất dò ANP huỳnh quang để phát hiện 18 kiểu gen HPV (các loại 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi trường hợp khác được nêu rõ ra, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống với nghĩa hiểu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thông thường, thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và được sử dụng chung.

Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đồng thời các kiểu gen HPV bằng cách sử dụng chất dò phát hiện kiểu gen HPV mà liên kết với chất chỉ thị và chất dập tắt.

Chất dò phát hiện của sáng chế chỉ ra tất cả các axit nucleic và thể tương tự axit nucleic mà liên kết bổ sung với các kiểu gen đặc hiệu HPV và có thể được chọn từ nhóm bao gồm oligonucleotit, ANP (axit nucleic peptit) và ANL (axit nucleic bị khóa). Các polymeraza dùng cho PCR thông thường thể hiện hoạt tính nucleaza, mà có thể gây tổn hại cho chất dò. Do đó, tốt hơn là sử dụng axit nucleic tổng hợp như ANP mà ổn định với nucleaza. Ngoài ra, vì chất dò phát hiện đóng vai trò phát hiện chọn lọc gen axit nucleic đích mong muốn, nên có khả năng sử dụng chất dò dùng để phát hiện axit nucleic đã biết trong lĩnh vực này. Thậm chí khi chất dò phát hiện của sáng chế là chất tương tự axit nucleic khác ANP, việc phân tích được thực hiện sử dụng chất dò

phát hiện MGB-taqman để xác nhận liệu có sự phát hiện axit nucleic đích hay không là khả thi. Kết quả là, có thể xác định được bằng đường cong khuếch đại thời gian thực mà chất dò MGB-taqman dùng để phát hiện đột biến và hệ thống chất dò ANP bám loại rộng vận hành trong các sợi khác nhau.

Theo sáng chế, tốt hơn là, chất dò ANP được sử dụng. Chất dò ANP, mà là ADN tổng hợp, có khả năng gắn kết đặc hiệu với ADN hoặc ARN của HPV đích và ổn định với nucleaza. Theo đó có khả năng phân tích đường cong nóng chảy căn cứ vào các chất dò.

Ngoài ra, theo sáng chế, chất dò phát hiện có thể đặt dưới sự thay đổi cấu trúc không gian bằng cách liên kết nhóm chức đặc hiệu như mạch nhánh của axit amin tự nhiên hoặc axit amin tổng hợp ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của chất dò hoặc vị trí liên kết alpha, beta, gamma của khung chất dò. Axit amin có thể được đặc trưng ở chỗ nó không tích điện hoặc có tích điện âm hoặc tích điện dương, nhưng không giới hạn ở đó, và có khả năng để sử dụng phương pháp thay thế cấu trúc không gian của chất dò và phương pháp truyền điện tích đã biết trong lĩnh vực này.

Chất dò ANP phát hiện kiểu gen HPV của sáng chế bao gồm một trong các chất mà có thể phát hiện 20 kiểu gen trong nhóm có nguy cơ cao (loại 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73 và 82 trong nhóm có nguy cơ cao), hai kiểu gen trong nhóm có nguy cơ thấp (loại 6 và 11 trong nhóm có nguy cơ thấp), và 18 kiểu gen khác mà thường được phát hiện ở người Hàn Quốc (các loại 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90). Trong ví dụ của sáng chế, chất dò phát hiện ANP có thể phát hiện kiểu gen HPV chứa một trong các trình tự bất kỳ của trình tự SEQ ID NO: 1 đến 65, 114 đến 121, và 148 đến 185 và được chọn từ nhóm bao gồm các kiểu gen 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 87 và 90.

Chất dò ANP phát hiện kiểu gen HPV của sáng chế có thể là các chất dò chung hoặc có phân tử tích điện âm. Khi chất dò ANP tích điện âm được sử dụng, độ phân giải của đường cong nóng chảy tăng, làm cho dễ phân tích nhiều kiểu gen trong ống phản ứng một lần.

Chất dò ANP theo sáng chế bao gồm phân tử tích điện âm mà có thể chứa ít nhất một phân tử tích điện âm được chọn từ tất cả các nhóm axit phosphoric, axit carboxylic, axit sulphonie, axit nitric và axit boric. Phân tử tích điện âm có thể được liên kết với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của chất dò hoặc vị trí alpha, beta hoặc gamma của mạch chính ANP. Ít nhất một phân tử tích điện âm có thể gắn kết với bazơ của chất dò liên tục hoặc gián đoạn.

Chất dò ANP theo sáng chế có thể được áp dụng cho kỹ thuật phát hiện nhiều kiểu gen HPV khác nhau do đặc tính về một nửa chiều rộng hẹp ở nửa tối đa của đồ thị đường cong nóng chảy. Ngoài ra, do độ phân giải cao của đường cong nóng chảy, đường cong nóng chảy được phân biệt theo trình tự của từng kiểu gen HPV, mà cho phép xác định đơn giản kiểu gen mà không cần phân tích bổ sung như phân tích trình tự của từng kiểu gen HPV.

Chất chỉ thị và chất dập tắt có thể dập tắt chất huỳnh quang có thể liên kết ở cả hai đầu của chất dò phát hiện của sáng chế, và chất dò có thể bao gồm chất huỳnh quang xen kẽ.

‘Chất chỉ thị’ là chất mà hấp thụ và phát ra ánh sáng có chiều dài bước sóng đặc biệt để phát ra huỳnh quang và đề cập đến chất mà được đánh dấu trên chất dò để xác nhận sự lai hóa giữa axit nucleic đích và chất dò. Có thể là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm fluorescein, fluorescein clorotriazinyl, xanh rhodamin, đỏ rhodamin, tetramethylrhodamin, FITC, xanh Oregon, bột Alexa, FAM, JOE, ROX, HEX, đỏ Texas, TET, TRITC, TAMRA, chất nhuộm màu xyanin, và chất nhuộm màu thiadicarboxyanin. Tốt hơn là, chất chỉ thị có thể là ít nhất một chất được chọn từ

nhóm bao gồm FAM (6-carboxyfluorescein), đỏ Texas, JOE, TAMRA, CY5 và CY3.

‘Chất dập tắt’ để chỉ chất mà hấp thụ ánh sáng được tạo ra bằng chất chỉ thị để giảm độ bền của chất huỳnh quang và có thể là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm Dabcyl, TAMRA, Eclipse, DDQ, QSY, chất dập tắt Blackberry, chất dập tắt Black Hole, Qxl, FQ đen Iowa, RQ đen Iowa và IRDye QC-1. Tốt hơn là sử dụng TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1, BHQ2 hoặc Dabsyl làm chất dập tắt, nhưng không giới hạn ở đó. Các loại khác của chất dập tắt có độ khử chất huỳnh quang khác nhau; do đó chất dập tắt có thể được sử dụng trong sự xem xét này.

Trong ví dụ, chất dò ANP bao gồm phân tử tích điện âm, chất chỉ thị và chất dập tắt phát ra tín hiệu huỳnh quang sau khi được lai với ADN đích. Khi nhiệt độ tăng, chất này nóng chảy với ADN đích ở nhiệt độ thích hợp để nóng chảy chất dò nhờ ảnh hưởng tích điện âm để dập tắt tín hiệu huỳnh quang. Chất dò ANP bao gồm chất dò tích điện âm, khi được so sánh với chất dò ANP mà không tích điện âm, được tách ra nhanh chóng khỏi ADN đích để tăng độ phân giải của đường cong nóng chảy. Bằng phép phân tích đường cong nóng chảy có độ phân giải cao thu được từ tín hiệu huỳnh quang do sự thay đổi nhiệt độ, kiểu gen HPV của ADN đích có thể được xác định.

‘Chất huỳnh quang xen vào’ có thể được chọn từ nhóm bao gồm acridin homodime và dẫn xuất của nó, màu cam Acridin và các dẫn xuất của nó, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) và dẫn xuất của nó, Actinomycin D và dẫn xuất của nó, ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridin) và dẫn xuất của nó, DAPI và dẫn xuất của nó, Dihydroethidium và dẫn xuất của nó, Ethidium bromua và dẫn xuất của nó, EthD-1 và dẫn xuất của nó, EthD-2 và dẫn xuất của nó, Hexidium iodua và dẫn xuất của nó, bisbenzimide (Hoechst 33258) và dẫn xuất của nó, Hoechst 33342 và dẫn xuất của nó, Hoechst 34580 và dẫn xuất của nó, hydroxystilbamidin và dẫn xuất của nó, LDS 751 và dẫn xuất của nó, Propidium Iodua(PI) và dẫn xuất của nó, và dẫn xuất Cy-dyes .

Trong ví dụ, chất dò liên kết với phân tử tích điện âm và chất huỳnh quang xen kẽ phát ra tín hiệu huỳnh quang sau khi được lai với ADN đích. Nó nóng chảy nhanh chóng với ADN đích ở nhiệt độ thích hợp để nóng chảy của chất dò nhờ tác động tích điện âm để dập tắt tín hiệu. Bằng cách phân tích đường cong nóng chảy của tín hiệu huỳnh quang có độ phân giải cao do nhiệt độ, các kiểu gen HPV có thể được xác định.

Ngoài ra, phép phân tích kiểu gen HPV đích theo sáng chế có thể bao gồm phép phân tích đường cong nóng chảy thu được từ sự phát hiện tín hiệu huỳnh quang mà không có sự liên kết trực tiếp giữa chất huỳnh quang xen kẽ và chất dò.

Nhìn chung, phép phân tích đường cong khuếch đại thông thường sử dụng real-time PCR, để phát hiện đồng thời nhiều kiểu gen HPV, sử dụng chất huỳnh quang trong phát hiện axit nucleic đích trong mẫu. Theo đó, có vấn đề là sự phát hiện đa thành phần bị hạn chế bởi vì, để phát hiện hai hoặc nhiều axit nucleic đích, chất dò mà có chất huỳnh quang nhiều bằng số lượng đích. Tuy nhiên, phương pháp phát hiện kiểu gen HPV đa thành phần đồng thời của sáng chế đặc trưng ở chỗ nhiều kiểu gen HPV có thể được phát hiện sử dụng một chất huỳnh quang bởi vì phép phân tích đường cong khuếch đại và đường cong nóng chảy có thể được thực hiện đồng thời bằng cách sử dụng các chất dò phát hiện.

Ngoài ra, phương pháp phát hiện kiểu gen HPV đa thành phần đồng thời sử dụng chất dò của sáng chế không bị giới hạn ở phép phân tích đồng thời đường cong khuếch đại và đường cong nóng chảy, nhưng khuếch đại và đường cong nóng chảy có thể được phân tích riêng biệt hoặc tuần tự. Chỉ một đường cong khuếch đại và đường cong nóng chảy có thể được phân tích khi cần thiết để phát hiện axit nucleic đích. Cụ thể là, khi phân tích định lượng không cần thiết, sự có mặt hoặc không có mặt axit nucleic đích, hoặc kiểu gen của nó có thể được xác định bằng phép phân tích đường cong nóng chảy mà không phân tích đường cong khuếch đại.

Phương pháp phát hiện kiểu gen HPV đa thành phần đồng thời của sáng chế bao

gồm cụ thể (a) bước tiến hành sự lai hóa bằng cách trộn chất dò phát hiện và đoạn môi trong mẫu mà chứa axit nucleic đích để thu được đường cong khuếch đại thời gian thực; (b) thu đường cong nóng chảy giữa sản phẩm được khuếch đại và chất dò phát hiện với sự thay đổi nhiệt độ sau khi khuếch đại; và (c) phân tích đường cong khuếch đại thời gian thực và đường cong nóng chảy thu được riêng biệt, tuần tự hoặc đồng thời.

Chất dò phát hiện của bước (a) có thể được điều chỉnh khác nhau theo kiểu gen HPV để phát hiện được. Sáng chế có thể được đặc trưng ở chỗ bước thu đường cong khuếch đại hoặc đường cong nóng chảy được thực hiện bằng real-time PCR (polymerase chain reaction) và phép phân tích đường cong khuếch đại được thực hiện bằng cách đo trị số Ct (cycle threshold-ngưỡng chu kỳ). Khi axit nucleic đích có trong mẫu hoặc mẫu có lượng lớn axit nucleic đích, số lượng chu kỳ đạt đến ngưỡng đi xuống và trị số Ct đo được thấp, từ đó sự vắng mặt hoặc kiểu gen của axit nucleic đích có thể xác định được và lượng ban đầu của axit nucleic đích có thể được tính toán.

Ngoài ra, phép phân tích đường cong nóng chảy, nhìn chung, là quy trình cuối cùng mà được tiến hành sau khi hoàn thành real-time PCR. Nhiệt độ của mẫu rơi đến 30 đến 55°C và sau đó mật độ tín hiệu huỳnh quang được tính toán khi nhiệt độ tăng 1°C trong nửa giây đến 95°C. Khi chất dò phát hiện và axit nucleic đích (chuỗi axit nucleic đích mà có thể liên kết bổ sung với chất dò phát hiện) được tách ra khi nhiệt độ tăng, chất huỳnh quang được dập tắt để giảm nhanh tín hiệu huỳnh quang, mà cho phép xác định, từ đỉnh nóng chảy, sự có mặt hoặc không có mặt axit nucleic đích.

Phương pháp phát hiện HPV đa thành phần đồng thời của sáng chế có thể đặc trưng ở chỗ có khả năng trong mẫu axit nucleic có 10^1 bản sao hoặc ít hơn.

Khi phân tích, theo phương pháp của sáng chế, đường cong khuếch đại thời gian thực và đường cong nóng chảy của các kiểu gen HPV 16, 18 và 52 dùng cho các nồng độ khác nhau từ 10^7 đến 10^0 bản sao, đã xác nhận rằng, như được thể hiện trong Fig. 2

đến 5, các kiểu gen HPV có 10^0 bản sao có thể được phát hiện và rằng sự phát hiện đồng thời đa thành phần là khả thi.

Kit của sáng chế có thể chứa chọn lọc đệm, đồng yếu tố polymeraza ADN và chất phản ứng, bao gồm deoxyribonucleotit-5-triphosphat, mà có khả năng thực hiện khuếch đại đích là phản ứng PCR (ví dụ, phản ứng PCR). Theo cách khác, kit của sáng chế có thể còn bao gồm nhiều phân tử polynucleotit khác nhau, transcriptaza ngược, các đệm khác nhau và chất phản ứng, và kháng thể ức chế hoạt tính ADN polymeraza.

Ngoài ra, lượng tối ưu chất phản ứng của kit được sử dụng cho phản ứng đặc hiệu có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thông thường kit của sáng chế được sản xuất dưới dạng gói riêng rẽ hoặc ngăn ô bao gồm các thành phần được đề cập ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Các ví dụ chỉ là các ví dụ của sáng chế và nó rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này mà phạm vi sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ.

Phân tích chất dò phát hiện và oligome ADN

Ví dụ 1

Ví dụ về chất dò ANP và oligome ADN đích được sử dụng để phát hiện HPV

1-1: Điều chế chất dò ANP

Chất dò ANP được sử dụng trong sáng chế được dự định phát hiện nhiều đích khác nhau bằng cách đánh dấu chất dò phát hiện mà có sự thay đổi cấu hình và thay đổi cấu trúc bằng cách truyền điện tích, và chất dò chung. Để xác nhận sự phát hiện và tính đặc hiệu của nhiều kiểu gen HPV bằng cách sử dụng oligome ANP, chất dò ANP được tổng hợp như trong bảng 1. Khi chất dò huỳnh quang ANP dùng để phát hiện các

kiểu gen HPV, chất dò với trình tự đặc hiệu với các kiểu gen HPV để phát hiện được được sử dụng, khi axit D-glutamic và axit L-glutamic có điện tích âm ở vị trí gamma của mạch chính của chất dò mà không bị biến đổi và chất dò ANP.

Bảng 1

Trình tự chất dò được sử dụng trong sáng chế

SEQ ID NO	Tên ANP	Trình tự chất dò ANP		
		Đầu tận cùng N	Trình tự ANP (N→C)	Đầu tận cùng C
1	chất dò huỳnh quang HPV 6-1	Dabcyl	GCATCCGTAACCTAC	OEK(HE X)
2	chất dò huỳnh quang HPV 6-2	Dabcyl	GCA②CCG②AAC② AC	OEK(HE X)
3	chất dò huỳnh quang HPV 6-3	Dab- K(Dab)	CATCCGTAACCTAC	OEK(Cy 5)
4	chất dò huỳnh quang HPV 11-1	Dabcyl	CTGTGTCTAAATCT	OEK(HE X)
5	chất dò huỳnh quang HPV 11-2	Dabcyl	CTG②GTC1AAATCT GC	OEK(HE X)
6	chất dò huỳnh quang HPV 11-3	Dabcyl	CTGTGTCTAAATCTG C	OK(FA M)
7	chất dò huỳnh quang HPV 16-1	Dabcyl	CCACATCTACTTCAG	OEK(HE X)
8	chất dò huỳnh quang HPV 16-2	Dabcyl	CCACA②C②ACT② CAG	OEK(HE X)
9	chất dò huỳnh quang HPV 16-3	Dabcyl	GCTGC④ATAT④TA CTTC	OEK(HE X)
10	chất dò huỳnh quang HPV 18-1	Dabcyl	ACACAGTCTCCTGT ACCT	OEK(RO X)
11	chất dò huỳnh quang HPV 18-2	Dabcyl	GTCTCCTGTACCTGG GCA	OEK(RO X)
12	chất dò huỳnh quang	Dabcyl	AGTCTCCTGTACCT	OEK(RO

	HPV 18-3			X)
13	chất dò huỳnh quang HPV 26-1	Dabcyl	GCATCTGCATCCAC	OEK(CY 5)
14	chất dò huỳnh quang HPV 26-2	Dabcyl	AGCATCTGCATCCA CTCC	OEK(CY 5)
15	chất dò huỳnh quang HPV 26-3	Dab- K(Dab)	TTAGTACATTATCTA G	OEK(Cy 5)
16	chất dò huỳnh quang HPV 33-1	Dabcyl	GCACACAAGTAACT	OEK(FA M)
17	chất dò huỳnh quang HPV 33-2	Dabcyl	GCACACAAG②AAC ②	OEK(FA M)
18	chất dò huỳnh quang HPV 45-1	Dabcyl	CAAAATCCTGTGCC AAGT	OEK(RO X)
19	chất dò huỳnh quang HPV 45-2	Dabcyl	ACAAAA②CC②GTG CC	OEK(RO X)
20	chất dò huỳnh quang HPV 45-3	Dabcyl	ACAAAA②CC②GTG CC	OEK(RO X)
21	chất dò huỳnh quang HPV 52-1	Dabcyl	GGAATACCTTCGTC	OEK(FA M)
22	chất dò huỳnh quang HPV 52-2	Dabcyl	ACCT2CG②CAAGGC G	OEK(FA M)
23	chất dò huỳnh quang HPV 52-3	Dab- K(Dab)	ACCT2CG2CAAGGCG	OEK(Cy 5)
24	chất dò huỳnh quang HPV 58-1	Dabcyl	GCACTGAAGTAACT AAG	OEK(FA M)
25	chất dò huỳnh quang HPV 58-2	Dabcyl	CTGAAGTAACTAAG	OEK(FA M)
26	chất dò huỳnh quang HPV 58-3	Dabcyl	GCACTGAAGTAACT AAG	OK(FA M)
27	chất dò huỳnh quang HPV 69-1	Dabcyl	ACAATCTGCATCTG CCA	OEK(HE X)
28	chất dò huỳnh quang HPV 69-2	Dabcyl	CAATCTGCATCTGCC AC	OEK(HE X)

29	chất dò huỳnh quang HPV 69-3	Dabcyl	CAATCTGCATCTGCC AC	OEK(RO X)
30	chất dò huỳnh quang HPV 73-1	Dabcyl	CAGGCTAGTAGCTC	OEK(FA M)
31	chất dò huỳnh quang HPV 73-2	Dabcyl	CTGTATGTGTAGG	OEK(FA M)
32	chất dò huỳnh quang HPV 73-3	Dabcyl	CAGGCTAGTAGCTC	OEK(HE X)
33	chất dò huỳnh quang HPV 31-1	Dabcyl	GCAAACAGTGATAC TACA	OEK(FA M)
34	chất dò huỳnh quang HPV 31-2	Dabcyl	GCAAACAGTGATAC TAC	OEK(FA M)
35	chất dò huỳnh quang HPV 31-3	Dabcyl	AACAG2GA2AC2AC	OEK(HE X)
36	chất dò huỳnh quang HPV 35-1	Dabcyl	TGCTGTGTCTTCTAG TGAC	OEK(HE X)
37	chất dò huỳnh quang HPV 35-2	Dabcyl	TGCTGTGTCTTCTAG T	OEK(HE X)
38	chất dò huỳnh quang HPV 35-3	Dabcyl	TGCTGTGTCTTCTAG TGAC	OK(FA M)
39	chất dò huỳnh quang HPV 39-1	Dabcyl	TATAGAGTCTTCCAT A	OEK(RO X)
40	chất dò huỳnh quang HPV 39-2	Dabcyl	TAGAG2CT2CCA2A	OEK(RO X)
41	chất dò huỳnh quang HPV 39-3	Dabcyl	TCTTCCATACCTTCT A	OEK(HE X)
42	chất dò huỳnh quang HPV 51-1	Dabcyl	TGCTGCGGTTTCCCC	OEK(FA M)
43	chất dò huỳnh quang HPV 51-2	Dabcyl	ACTGC1GCAG1TTCC	OEK(FA M)
44	chất dò huỳnh quang HPV 51-3	Dab- K(Dab)	TTTACTCCAAGTAA	OEK(Cy 5)
45	chất dò huỳnh quang	Dabcyl	TACATATAATTCAA	OEK(HE

	HPV 53-1		AG	X)
46	chất dò huỳnh quang HPV 53-2	Dabcyl	CTACATATAATTCA AAG	OEK(HE X)
47	chất dò huỳnh quang HPV 53-3	Dabcyl	ACATATAATTCAAA G	OK(FA M)
48	chất dò huỳnh quang HPV 56-1	Dabcyl	AGTATTGCTACAGA	OEK(HE X)
49	chất dò huỳnh quang HPV 56-2	Dabcyl	AGTACTGCTACAGA AC	OEK(HE X)
50	chất dò huỳnh quang HPV 56-3	Dabcyl	CTACAGAACAGTTA A	OK(ROX)
51	chất dò huỳnh quang HPV 59-1	Dabcyl	GCTTCTACTACTTCT T	OEK(RO X)
52	chất dò huỳnh quang HPV 59-2	Dabcyl	GCT2CTAC2ACTTCT T	OEK(RO X)
53	chất dò huỳnh quang HPV 59-3	Dabcyl	GCT2CTAC2ACTTCT T	OEK(HE X)
54	chất dò huỳnh quang HPV 66-1	Dabcyl	CAACATGACTATTA AT	OEK(FA M)
55	chất dò huỳnh quang HPV 66-2	Dabcyl	CAACA2GAC2AT2AA T	OEK(FA M)
56	chất dò huỳnh quang HPV 66-3	Dab- K(Dab)	ATTAATGCAGCTAA	OEK(Cy 5)
57	chất dò huỳnh quang HPV 68-1	Dabcyl	TCTACTACTGAATCA	OEK(RO X)
58	chất dò huỳnh quang HPV 68-2	Dabcyl	TC2AC2ACTACAGA	OEK(RO X)
59	chất dò huỳnh quang HPV 68-3	Dabcyl	TC2AC2ACTACAGA	OEK(RO X)
60	chất dò huỳnh quang HPV 70-1	Dabcyl	CTGCTGTATATAGCC	OEK(CY 5)
61	chất dò huỳnh quang HPV 70-2	Dabcyl	ATAGCCCTACAAAG TT	OEK(CY 5)

62	chất dò huỳnh quang HPV 70-3	Dabcyl	CTGCTGTATTTAGCC	OK(ROX)
63	chất dò huỳnh quang HPV 82-1	Dabcyl	TAACCATTAGCACT	OEK(CY 5)
64	chất dò huỳnh quang HPV 82-2	Dabcyl	CACTGCTGTTACTCC A	OEK(CY 5)
65	chất dò huỳnh quang HPV 82-3	Dab- K(Dab)	GCACTGCTGTTACTC	OEK(Cy 5)

(Trong trình tự ANP của bảng 1, các điểm đánh dấu số là nơi mà một phần của trình tự ANP được biến đổi thành D-glutamin và L-glutamin

Mỗi chất dò kiểu gen HPV được tạo cấu trúc trong sự xem xét đến trình tự trong vùng L1 của HPV với tính đặc hiệu cao đối với kiểu gen và trị số T_m . Trong trường hợp nơi mà trị số T_m của các kiểu gen khác nhau chồng lên nhau, chất huỳnh quang được đánh dấu trên chất dò ANP được thay đổi để xác định đồng thời các kiểu gen khác nhau trong một ống. Ngoài ra, cấu hình của từng chất dò được thay đổi, và số lượng các phân tử đã được thay đổi và vị trí của nó được điều chỉnh đến trị số T_m của ANP huỳnh quang.

Bảng 2

Sự biến đổi trình tự ANP

Dạng	Bazơ	Điểm	Dạng	Bazơ	Điểm
Axit glutamic D-	A	①	Axit L- glutamic	A	1
	T	②		T	2
	G	③		G	3
	C	④		C	4

Chất dò ANP được tổng hợp bằng tổng hợp pha rắn trừ oligome ANP sử dụng các monome ANP được bảo vệ bởi benzothiazolesulfonyl (Bts) và nhựa chức năng hóa theo phương pháp được mô tả trong Patent Hàn Quốc số 464261 (Lee *et al.*, *Org. Lett.*,

9:3291, 2007). ANP có thể được tổng hợp bằng phương pháp đã biết của 9-flourenylmethoxycarbonyl (Fmoc) hoặc t-Boc(t-butoxycarbonyl) (Kim L. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 59:5767, 1994; Stephen A. *et al.*, *Tetrahedron*, 51:6179, 1995), và chất thông báo và chất dập tắt được đánh dấu lên chất dò ANP theo phương pháp được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực này.

1-2: Sản xuất oligome ADN

Chất dò ANP trong bảng do chính các tác giả sáng chế sản xuất và các oligome khác nhau được sử dụng cho phản ứng PCR như trong bảng 3 được tổng hợp bởi Bionic (Korea). Cụ thể là, để cải thiện độ nhạy phát hiện HPV và để xác định sự có mặt hoặc không có mặt sự đa nhiễm với các kiểu gen HPV bằng phản ứng real-time PCR, các cặp mồi là các alen đặc hiệu với các kiểu gen phát hiện được được tạo cấu trúc và độ nhạy việc phát hiện kiểu gen HPV và tính đặc hiệu phụ thuộc vào việc trộn các cặp mồi và chất dò huỳnh quang ANP được phân tích.

Bảng 3

Trình tự oligome ADN để phân tích đặc trưng của chất dò ANP

SEQ ID NO	Tên	Trình tự (5' → 3')
66	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
67	MY12	GGACAGGGHCAYAAYAATGG
68	đoạn mồi đặc hiệu HPV 6-1	TGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTAC
69	đoạn mồi đặc hiệu HPV 6-2	TGTAAATCATACTCTTCCACATGACG
70	đoạn mồi đặc hiệu HPV 11-1	GAATACATGCGCCATGTGGAGGA
71	đoạn mồi đặc hiệu HPV 11-2	GCGCATGTATTCCTTATAATCTGA
72	đoạn mồi đặc hiệu	ACTAACTTTAARGAGTACCTACGACA

	HPV 16-1	
73	đoạn môi đặc hiệu HPV 16-2	CYTCCCCATGTCGTAGGTACTC
74	đoạn môi đặc hiệu HPV 18-1	CTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGA
75	đoạn môi đặc hiệu HPV 18-2	TCTGCTATACTGCTTAAATTTGGTAGCA TC
76	đoạn môi đặc hiệu HPV 26-1	GACATGGCGAAGAATATGAATTACAAT T
77	đoạn môi đặc hiệu HPV 26-2	TCTGTTGTAAGTGTTATTTTACACAAC T
78	đoạn môi đặc hiệu HPV 33-1	CATGTTGAAGAATATGATYTACAGTTT G
79	đoạn môi đặc hiệu HPV 33-2	CAAACGTARATCATATTCTTCAACATG TC
80	đoạn môi đặc hiệu HPV 45-1	AGTAGACATGTGGAGGAATATGATTTA CA
81	đoạn môi đặc hiệu HPV 45-2	CTCCACATGTCTACTATACTGC
82	đoạn môi đặc hiệu HPV 52-1	TACAATTTATTTTCAATTGTGCAARA
83	đoạn môi đặc hiệu HPV 52-2	AGCYGTTAATGTAATYTTGCACAATTG A
84	đoạn môi đặc hiệu HPV 58-1	ATGTTGAAGARTATGACTTACAGTTTGT T
85	đoạn môi đặc hiệu HPV 58-2	AACAAACTGTAAGTCATAYTCTTCAAC AT
86	đoạn môi đặc hiệu HPV 69-1	CAGTTTATAAGGCATGGTGAG
87	đoạn môi đặc hiệu HPV 69-2	TCCTCACCATGCCTTATAAACTG
88	đoạn môi đặc hiệu HPV 73-1	AGACATGCAGAAGAGTTTGATTACAG

89	đoạn môi đặc hiệu HPV 73-2	TAGTAGAATTCATAGAATGTATATATG TCATTACCT
90	đoạn môi đặc hiệu HPV 31-1	GACATGGTGAGGAATTYGATTTACAAT T
91	đoạn môi đặc hiệu HPV 31-2	CRAATTCCTCACCATGTCKTAAATAC
92	đoạn môi đặc hiệu HPV 35-1	CTTCTAAGTTTAAGGAATATAACCAGGC AC
93	đoạn môi đặc hiệu HPV 35-2	CTTCACCATGCCTTAAATATTC
94	đoạn môi đặc hiệu HPV 39-1	GACATGTTGAAGAATATGATYTACAGT TTG
95	đoạn môi đặc hiệu HPV 39-2	CGTGCCTGGTATATTCCTTAAACTTAGA
96	đoạn môi đặc hiệu HPV 51-1	GAATATTTAAGGCATGGTGAAGAATAT G
97	đoạn môi đặc hiệu HPV 51-2	CTAATATATTGCTTAAAGTTACTTGGAG
98	đoạn môi đặc hiệu HPV 53-1	CATGCAGAGGAATATGAATTACAATTT G
99	đoạn môi đặc hiệu HPV 53-2	ATTCCTCTGCATGYCTAACATACTG
100	đoạn môi đặc hiệu HPV 56-1	ATCAGTACCTTAGACATGTGGAGGART ATG
101	đoạn môi đặc hiệu HPV 56-2	CTCCACATGTCTAAGGTACTGAT
102	đoạn môi đặc hiệu HPV 59-1	CAGTTTTAAAGAATATGCCAGACATG
103	đoạn môi đặc hiệu HPV 59-2	GTCTGGCATATTCTTTAAAACTG
104	đoạn môi đặc hiệu HPV 66-1	TGAAATCAATCAATACCTTCGCCATGT G
105	đoạn môi đặc hiệu	CATGGCGAAGGTATTGATTGATTTC

	HPV 66-2	
106	đoạn môi đặc hiệu HPV 68-1	TTAGGCATGTTGAGGAATATGATTTGC
107	đoạn môi đặc hiệu HPV 68-2	CAAATCATATTCCTCAACATGCCTAAC
108	đoạn môi đặc hiệu HPV 70-1	GCATGTGGAGGAATATGATTTACAA
109	đoạn môi đặc hiệu HPV 70-2	TCCACATGCCTAGTATATTCCT
110	đoạn môi đặc hiệu HPV 82-1	CAATTTATATTTCAATTGTGTAATAATCA
111	đoạn môi đặc hiệu HPV 82-2	TAGAATCCATGGTGTGCAGGTAA

Để xác định 11 loại HPV trong một ống phản ứng, chất dò huỳnh quang ANP với trình tự SEQ ID NO: 1 đến 32 trong bảng 1 được trộn với tỷ lệ thích hợp tương ứng với cặp môi với trình tự SEQ ID NO: 66 đến 89 trong bảng 3. Và sau đó tiến hành phản ứng real-time PCR để xác định trị số T_m của từng chất dò huỳnh quang bằng phép đo nóng chảy, và chế phẩm 11 loại chất dò mà không có tín hiệu huỳnh quang chồng lên nhau và các trị số T_m được lựa chọn. Việc sử dụng chế phẩm 11 chất dò được chọn, phản ứng PCR được tiến hành và độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của các kiểu gen HPV được phân tích. Ngoài ra, để xác định 11 loại HPV trong ống phản ứng khác, chất dò huỳnh quang ANP với SEQ ID NO: 33 đến 65 trong bảng 1 được trộn ở tỷ lệ thích hợp tương ứng với các cặp môi với SEQ ID NO: 66, 67 và 90 đến 111 trong bảng 3 và sau đó thực hiện phản ứng real-time PCR để xác định trị số T_m của từng chất dò huỳnh quang bằng phép đo nóng chảy, và chế phẩm 11 loại chất dò mà không có tín hiệu huỳnh quang chồng lên nhau và các trị số T_m được lựa chọn. Việc sử dụng chế phẩm 11 chất dò được chọn, phản ứng PCR được tiến hành và độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của các kiểu gen HPV được phân tích.

Ví dụ 2

Phân tích phản ứng theo hỗn hợp chất dò ANP và oligome ADN

2-1: Sản xuất axit nucleic đích

Các ADN được sử dụng làm axit nucleic đích là 22 kiểu gen của HPV dùng để xác nhận tính đặc hiệu và độ nhạy của chế phẩm chất dò và các cặp mồi. Đối với mỗi trong số 22 kiểu gen của HPV, 10^{10} đến 10^0 bản sao ADN được sản xuất làm axit nucleic đích.

2-2. Phân tích phản ứng của hỗn hợp chất dò ANP và các mồi khác nhau

1) Để xác định độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của 11 kiểu gen HPV (6, 11, 16, 18, 26, 33, 45, 52, 58, 69 và 73) theo chất dò huỳnh quang ANP đặc hiệu đích được sản xuất trong ví dụ 1-1 và các loại đoạn mồi đặc hiệu đích được sản xuất trong ví dụ 1-2, $0,15\mu\text{M}$ mỗi chất dò huỳnh quang ANP với SEQ ID NO: 1 đến 32 trong bảng 1, $0,15\mu\text{M}$ mỗi cặp mồi với SEQ ID NO: 66 và 67 trong bảng 3, và $1,2\mu\text{M}$ mỗi cặp mồi với SEQ ID NO: 68 đến 89 trong bảng 3 được trộn, mà dung dịch khuếch đại PCR (Enzymomics, Korea) và mỗi axit nucleic đích được sản xuất được bổ sung vào đó. Sau đó, phản ứng được tiến hành sử dụng máy real-time PCR (CFX96™ Real-time PCR System from Bio-Rad, USA). Bốn mươi lăm chu kỳ được thực hiện mà chu kỳ bao gồm phản ứng ở 50°C trong hai phút và 95°C trong 15 phút, sau đó là phản ứng ở 95°C trong 15 giây, 55°C trong 45 giây, và 72°C trong 15 giây. Chất huỳnh quang của chất dò ANP được đo ở 55°C . Sau đó, nhiệt độ được duy trì ở 95°C trong năm phút trước khi giảm xuống 35°C . Sau đó, chất dò ANP và sản phẩm phản ứng PCR được lai trong năm phút, trước khi nâng nhiệt độ $0,5^\circ\text{C}$ từ 35°C đến 80°C trong suốt quá trình mà tín hiệu huỳnh quang được đo và đường cong nóng chảy được đo được phân tích.

2) Ngoài ra, để xác định độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của 11 kiểu gen HPV (31, 35, 39, 51, 53, 56, 59, 66, 68, 70 và 82) theo các chất dò huỳnh quang ANP đặc hiệu đích được sản xuất trong ví dụ 1-1 và các loại đoạn mồi đặc hiệu đích được sản

xuất trong ví dụ 1-2, 0,15 μ M mỗi chất dò huỳnh quang ANP với SEQ ID NO: 33 đến 65 trong bảng 1, 0,15 μ M mỗi cặp môi với SEQ ID NO: 66 và 67 trong bảng 3, và 1,2 μ M mỗi cặp môi với SEQ ID NO: 90 đến 111 trong bảng 3 được trộn mà dung dịch khuếch đại PCR (Enzynomics, Korea) và mỗi axit nucleic đã sản xuất được bổ sung vào đó. Sau đó, phản ứng được tiến hành sử dụng máy real-time PCR (CFX96TM Real-time PCR System from Bio-Rad, USA). Bốn mươi lăm chu kỳ được thực hiện mà chu kỳ bao gồm phản ứng ở 50°C trong hai phút và 95°C trong 15 phút, sau đó là phản ứng ở 95°C trong 15 giây, 55°C trong 45 giây, và 72°C trong 15 giây. Chất huỳnh quang của chất dò ANP được đo ở 55°C. Sau đó, nhiệt độ được duy trì ở 95°C trong năm phút trước khi giảm xuống 35°C. Sau đó, chất dò ANP và sản phẩm phản ứng PCR được lai trong năm phút, trước khi nâng nhiệt độ 0,5°C từ 35°C đến 80°C trong suốt quá trình mà tín hiệu huỳnh quang được đo và đường cong nóng chảy được đo được phân tích.

2-3: Phân tích tính đặc hiệu và phản ứng của hỗn hợp chất dò ANP được chọn và các môi

Để xác định độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của 11 kiểu gen HPV (6, 11, 16, 18, 26, 33, 45, 52, 58, 69 và 73) đã được xác định trong mục 2) của ví dụ 2-2, 0,15 μ M từng hỗn hợp chất dò với SEQ ID NO: 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 và 65 trong số các chất dò với SEQ ID NO: 33 đến 65 trong bảng 1 và cặp môi với SEQ ID NO: 66 và 67 trong bảng 3, và 1,2 μ M mỗi cặp môi với SEQ ID NO: 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 và 89 được trộn mà dung dịch khuếch đại PCR (Enzynomics, Korea) và mỗi axit nucleic đã sản xuất được bổ sung vào đó (Fig. 3).

Ngoài ra, để xác định độ nhạy phát hiện và tính đặc hiệu của các loại đoạn môi đặc hiệu đích và 11 kiểu gen HPV (31, 35, 39, 51, 53, 56, 59, 66, 68, 70 và 82) được xác định trong 2) của ví dụ 2-2, 1,2 μ M từng hỗn hợp chất dò với SEQ ID NO: 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 và 65 trong số các chất dò với SEQ ID NO: 33 đến 65

trong bảng 1 và các cặp mồi với SEQ ID NO: 66 và 67 trong bảng 3, và 1,2 μ M mỗi cặp mồi với SEQ ID NO: 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 và 111 được trộn, mà dung dịch khuếch đại PCR (Enzynomics, Korea) và mồi axit nucleic đã sản xuất được bổ sung vào đó. Sau đó, phản ứng được tiến hành sử dụng máy real-time PCR (CFX96TM Real-time PCR System from Bio-Rad, USA). Bốn mươi lăm chu kỳ được thực hiện mà chu kỳ bao gồm phản ứng ở 50°C trong hai phút và 95°C trong 15 phút, sau đó là phản ứng ở 95°C trong 15 giây, 55°C trong 45 giây, và 72°C trong 15 giây. Chất huỳnh quang của chất dò ANP được đo ở 55°C. Sau đó, nhiệt độ được duy trì ở 95°C trong năm phút trước khi giảm xuống 35°C. Sau đó, chất dò ANP và sản phẩm phản ứng PCR được lai trong năm phút, trước khi nâng nhiệt độ 0,5°C từ 35°C đến 80°C trong suốt quá trình mà tín hiệu huỳnh quang được đo và đường cong nóng chảy được đo được phân tích.

Kết quả là, đã xác nhận rằng, trong phản ứng PCR sử dụng hỗn hợp chất dò huỳnh quang ANP đặc hiệu với các kiểu gen HPV và các cặp mồi, tính đặc hiệu trong phát hiện các kiểu gen HPV cao và có khả năng xác định các kiểu gen HPV với độ nhạy tuyệt vời.

2-4: Các cặp mồi và hệ thống chất huỳnh quang dùng để xác định các kiểu gen HPV

Để phát hiện các kiểu gen HPV khác mà không thể phát hiện được bằng hệ thống nêu trên với hỗn hợp các cặp mồi và chất dò, đã xác nhận là, trong phản ứng PCR, có hay không nhiều kiểu gen HPV được phát hiện, bằng cách tạo cấu trúc cặp mồi xuôi MY11 và 12 và mồi ngược GP6, mà là hệ thống mồi đã biết rõ có khả năng phát hiện kiểu gen HPV, và chất dò huỳnh quang đến các vị trí trình tự nơi mà sự phát hiện bằng cách sử dụng hệ phát hiện chất huỳnh quang SYBR green và sự phát hiện nhiều kiểu gen HPV khác nhau là khả thi bằng cách sử dụng các vị trí trình tự PGMY09 như trong bảng 4.

Bảng 4

Đoạn mồi và hệ thống chất dò để phát hiện các kiểu gen HPV

SEQ ID NO	Tên	Trình tự (5' → 3')
112	GP6	TGATTACAGTTTATTTTTC
113	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC
114	ANP phát hiện HPV - 1	TTTGTTACTGTGGTAGATAC
115	ANP phát hiện HPV - 2	TTTGTTACAGTTGTGGATAC
116	ANP phát hiện HPV - 3	TTTGTAAGTGTGTAGATAC
117	ANP phát hiện HPV - 4	TTTATTACCTGTGTTGATAC
118	ANP phát hiện HPV - 5	TTTGTAAGTGTGTGGATAC
119	ANP phát hiện HPV - 6	TTTTTAAGTGTGGTGGACAC
120	ANP phát hiện HPV - 7	TTTATTACTTGTGTTGACAC
121	ANP phát hiện HPV - 8	TTTGTCACGGTGGTAGATAC

Kết quả là, đã xác nhận rằng hệ thống dò phát hiện SYBR sử dụng cặp mồi với SEQ ID NO: 66, 67, 112 và 113 có khả năng phát hiện tất cả 18 kiểu gen HPV (các loại 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90) khác 22 loại (các loại 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73 và 82) bằng các trị số Ct sau phản ứng PCR (Fig. 4). Ngoài ra, đã xác nhận rằng các kiểu gen HPV khác nhau có thể được phát hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp chất dò huỳnh quang của hệ thống phát hiện chất dò 114 đến 121. Trong hệ thống phát hiện sử dụng SYBR green, việc phân tích tính đặc hiệu là khả thi từ các mẫu dương tính và âm tính và, trong trường hợp dương tính giả, phân tích các trị số Tm. Trong hệ thống phát

hiện sử dụng hỗn hợp chất dò, có khả năng xác định giữa các mẫu dương tính và âm tính với tính đặc hiệu vì sản phẩm phản ứng PCR HPV được khuếch đại bằng các cặp mồi được liên kết với chất dò huỳnh quang ANP đặc hiệu.

2-5: Hệ thống cặp mồi và chất dò huỳnh quang dùng để phát hiện các kiểu gen HPV

Đã được xác định, trong phản ứng PCR, có hay không 18 kiểu gen HPV (các loại 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 74, 81, 83, 84, 87 và 90) mà không thể phát hiện được trong hệ thống nêu trên chứa hỗn hợp các cặp mồi và chất dò có thể được phát hiện bằng cặp mồi xuôi MY11 và 12, mà là hệ thống đoạn mồi mà có thể phát hiện 18 kiểu gen HPV, và chất dò huỳnh quang đến các vị trí của các trình tự mà sự phát hiện sử dụng các mồi ngược đặc hiệu mà có khả năng khuếch đại từng trong số 18 kiểu gen HPV, và sự phát hiện 18 kiểu gen HPV là khả thi, được tạo cấu trúc như trong bảng 5 và 6.

Bảng 5

SEQ ID NO	Tên	Trình tự (5' → 3')
122	đoạn mồi đặc hiệu HPV 55-1	CAGGGCCACAATAATGG
123	đoạn mồi đặc hiệu HPV 55-2	GCGCAGGGCCACAATAATGG
124	đoạn mồi đặc hiệu HPV 74-1	GCGCAAGGCCACAAT
125	đoạn mồi đặc hiệu HPV 74-2	GCGCAAGGCCACAATAATGG
126	đoạn mồi đặc hiệu HPV 87-1	CCCAGGGCCACAATAAT
127	đoạn mồi đặc hiệu HPV 87-2	GCCCAGGGCCACAATAATGG
128	đoạn mồi đặc hiệu HPV FHBB-1	CATTGCTTCTGACACAAC

129	đoạn môi đặc hiệu HPV FHBB-2	GCTTACATTTGCTTCTGACAC AAC
130	đoạn môi đặc hiệu HPV 30-1	CTGTAATTCATATTCCTC
131	đoạn môi đặc hiệu HPV 30-2	CTGTAATTCATATTCCTCTAC ATGTC
132	đoạn môi đặc hiệu HPV 42-1	GCACATCATATTCTTCAGCA
133	đoạn môi đặc hiệu HPV 42-2	GCACATCATATTCTTCAGCAT GTC
134	đoạn môi đặc hiệu HPV 61-1	AAATCAAACCTCCTCTGTATG
135	đoạn môi đặc hiệu HPV 61-2	TGGCAAATCAAACCTCCTGT ATGGC
136	đoạn môi đặc hiệu HPV 62-1	AAATCAAATTCCTCCG
137	đoạn môi đặc hiệu HPV 62-2	GCAAATCAAATTCCTCCGTGT GTC
138	đoạn môi đặc hiệu HPV 83-1	TCATATTCCTCTGTGTG
139	đoạn môi đặc hiệu HPV 83-2	GTAAGTCATATTCCTCTGTGT GGCGG
140	đoạn môi đặc hiệu HPV RHBB-1	CATCCACGTTACCTTGCC
141	đoạn môi đặc hiệu HPV RHBB-2	TTCATCCACGTTACCTTGCC
142	đoạn môi đặc hiệu HPV R1-1	AYTGYAIKTCAWAYTCYTCIIC AT
143	đoạn môi đặc hiệu HPV R1-2	AAAYTGYAIKTCAWAYTCYTC IICATG
144	đoạn môi đặc hiệu HPV R2-1	AYTGYAADTCAWAYTCYTCII C
145	đoạn môi đặc hiệu HPV	AAAYTGYAADTCAWAYTCYT

	R2-2	CIICATG
146	đoạn môi đặc hiệu HPV R3-1	TGYAAATCAWAYTCYT CIICA TG
147	đoạn môi đặc hiệu HPV R3-2	AAAYTGYAAATCAWAYTCYT CIICATG

Bảng 6

SEQ ID NO	Tên ANP	Trình tự chất dò ANP		
		Đầu tận cùng N	Trình tự ANP (N→C)	Đầu tận cùng C
148	chất dò huỳnh quang HPV 30-1	Dabcyl	CCACACAAACGTTAT CCAC	OK(FA M)
149	chất dò huỳnh quang HPV 30-2	Dabcyl	CCACACAAACGTTAT CC	OK(FA M)
150	chất dò huỳnh quang HPV 32-1	Dabcyl	TACTGTAACAACCTGA AGAC	OK(FA M)
151	chất dò huỳnh quang HPV 32-1	Dabcyl	CTACTGTAACAACCTG AAG	OK(FA M)
152	chất dò huỳnh quang HPV 34-1	Dabcyl	CAATCCACAAGTACA ACTGC	OK(FA M)
153	chất dò huỳnh quang HPV 34-2	Dabcyl	GTAGGTACACAATCC AC	OK(FA M)
154	chất dò huỳnh quang HPV 40-1	Dabcyl	ACACCAACCCCATATA	OK(FA M)
155	chất dò huỳnh quang HPV 40-2	Dabcyl	CCACACCAACCCCAT ATA-	OK(FA M)
156	chất dò huỳnh quang HPV 42-1	Dabcyl	TGCAACATCTGGTGA TA	OK(FA M)
157	chất dò huỳnh quang HPV 42-2	Dabcyl	CTGCAACATCTGGTG ATAC	OK(FA M)
158	chất dò huỳnh quang HPV 43-1	Dabcyl	CTCTACTGACCCTACT GTG	OK(FA M)
159	chất dò huỳnh quang HPV 43-2	Dabcyl	CTCTACTGACCCTACT G	OK(FA M)

160	chất dò huỳnh quang HPV 44-1	Dabcyl	CACAGTCCCCTCCGT	OK(FA M)
161	chất dò huỳnh quang HPV 44-2	Dabcyl	TACACAGTCCCCTCC GT	OK(FA M)
162	chất dò huỳnh quang HPV 54-1	Dabcyl	TCCACGCAGGATAGC	OK(FA M)
163	chất dò huỳnh quang HPV 54-2	Dabcyl	CAGCATCCACGCAGG ATAGC	OK(FA M)
164	chất dò huỳnh quang HPV 55-1	Dabcyl	CAACTCAGTCTCCAT C	OK(FA M)
165	chất dò huỳnh quang HPV 55-2	Dabcyl	CAACTCAGTCTCCA	OK(FA M)
166	chất dò huỳnh quang HPV 61-1	Dabcyl	CCCCCCTGTATCTGA A	OK(FA M)
167	chất dò huỳnh quang HPV 61-2	Dabcyl	CCTGTATCTGAATA	OK(FA M)
168	chất dò huỳnh quang HPV 62-1	Dabcyl	CTGCAGCAGAAT	OK(FA M)
169	chất dò huỳnh quang HPV 62-2	Dabcyl	CGCCTCCACTGCTGC AGC	OK(FA M)
170	chất dò huỳnh quang HPV 67-1	Dabcyl	ATCAGAGGCTAC	OK(FA M)
171	chất dò huỳnh quang HPV 67-2	Dabcyl	TCAGAGGCTACATA	OK(FA M)
172	chất dò huỳnh quang HPV 74-1	Dabcyl	CTCACAATCGCCTTCT GC	OK(FA M)
173	chất dò huỳnh quang HPV 74-2	Dabcyl	CACAATCGCCTTCTG	OK(FA M)
174	chất dò huỳnh quang HPV 81-1	Dabcyl	CAGCTACATCTGCTG C	OK(FA M)
175	chất dò huỳnh quang HPV 81-2	Dabcyl	CAGCTACATCTGCT	OK(FA M)
176	chất dò huỳnh quang	Dabcyl	CAGCTGCTGCTACAC	OK(FA

	HPV 83-1			M)
177	chất dò huỳnh quang HPV 83-2	Dabcyl	CAGCTGCTGCTAC	OK(FA M)
178	chất dò huỳnh quang HPV 84-1	Dabcyl	CCACCACCGAATCAG	OK(FA M)
179	chất dò huỳnh quang HPV 84-2	Dabcyl	CACCACCGAATCAGA A	OK(FA M)
180	chất dò huỳnh quang HPV 87-1	Dabcyl	CACTCAAACAACCAC TG	OK(FA M)
181	chất dò huỳnh quang HPV 87-2	Dabcyl	CTCAAACAACCACTG A	OK(FA M)
182	chất dò huỳnh quang HPV 90-1	Dabcyl	ACCCTCTGACACAT	OK(FA M)
183	chất dò huỳnh quang HPV 90-2	Dabcyl	CCTCTGACACAT	OK(FA M)
184	chất dò huỳnh quang HBB-1	Dab-K(Dab)	AGTCTGCCGTTACTG CC	OEK(Cy 5)
185	chất dò huỳnh quang HBB-2	Dab-K(Dab)	GTCTGCCGTTACTGC	OEK(Cy 5)

Kết quả là, đã xác nhận rằng hệ thống phát hiện sử dụng hỗn hợp cặp mồi với trình tự SEQ ID NO: 66, 67 và 122 đến 147 và chất dò huỳnh quang của hệ thống phát hiện chất dò 148 đến 185 có thể phát hiện tất cả 18 kiểu gen HPV bằng các trị số Ct sau phản ứng PCR (Fig. 5). Trong hệ thống phát hiện sử dụng hỗn hợp chất dò huỳnh quang, có khả năng xác định giữa mẫu dương tính và âm tính có tính đặc hiệu vì các sản phẩm phản ứng PCR HPV được khuếch đại bằng các cặp mồi được liên kết với chất dò huỳnh quang ANP đặc hiệu.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế có thể được áp dụng cho phương pháp phát hiện kiểu gen của virus papilloma ở người. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến chất dò phát hiện mà có khả năng gắn kết đặc hiệu kiểu gen với ADN của HPV, kit phát hiện chứa chúng, và phương

pháp phát hiện các kiểu gen HPV sử dụng chúng. Sáng chế có khả năng phát hiện chính xác 22 kiểu gen HPV đã được phát hiện trong cổ tử cung, chẩn đoán sự đồng nhiễm một hoặc nhiều kiểu gen HPV, phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của các kiểu gen HPV khác 22 kiểu gen, và phát hiện các kiểu gen HPV với độ nhạy và tính đặc hiệu cao.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hỗn hợp chất dò bao gồm chất dò ANP (axit nucleic peptide) chứa một trong các trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 đến 65, 114 đến 121 và 148 đến 185,

trong đó axit amin, mạch nhánh của axit amin hoặc phân tử tích điện âm được liên kết với chất dò ANP, và chất chỉ thị và chất dập tắt được liên kết với chất dò PNA, và chất dò ANP có khả năng gắn kết đặc hiệu kiểu gen với ADN của virus papilloma ở người (Human Papillomavirus-HPV).

2. Hỗn hợp chất dò theo điểm 1, trong đó chất dò ANP phát hiện kiểu gen HPV được chọn từ nhóm bao gồm các loại 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 87 và 90.

3. Hỗn hợp chất dò theo điểm 1, trong đó axit amin, mạch nhánh của axit amin hoặc phân tử tích điện âm được liên kết với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của chất dò.

4. Hỗn hợp chất dò theo điểm 1, trong đó axit amin, mạch nhánh của axit amin hoặc phân tử tích điện âm được liên kết với vị trí alpha, beta hoặc gamma của mạch chính chất dò.

5. Hỗn hợp chất dò theo điểm 1, trong đó chất chỉ thị là ít nhất một chất huỳnh quang được chọn từ nhóm bao gồm fluorescein, fluorescein chlorotriazinyl, xanh rhodamin, đỏ rhodamin, tetramethylrhodamin, FITC, xanh Oregon, Alexa Flo, FAM, JOE, ROX, HEX, đỏ Texas, CY5, CY3, TET, TRITC, TAMRA, chất nhuộm màu xyanin và chất nhuộm màu thiadicarboxyanin.

6. Hỗn hợp chất dò theo điểm 1, trong đó chất dập tắt là ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm chất dập tắt Dabcyl, TAMRA, Eclipse, DDQ, QSY, Blackberry, chất dập tắt Black Hole, Qxl, Iowa black FQ, Iowa black RQ và IRDye QC-1.

7. Phương pháp phát hiện kiểu gen HPV, sử dụng một hoặc nhiều chất dò phát hiện

dùng để phát hiện tại thời điểm thực tại axit nucleic đích,

trong đó chất dò phát hiện bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 đến 65, 114 đến 121 và 148 đến 185, và trong đó axit amin, mạch nhánh của axit amin hoặc phân tử tích điện âm được liên kết với chất dò ANP, và chất chỉ thị và chất dập tắt được liên kết với chất dò phát hiện, và chất dò phát hiện là chất dò phát hiện ANP mà có khả năng gắn kết đặc hiệu kiểu gen với ADN của HPV.

8. Phương pháp theo điểm 7, bao gồm:

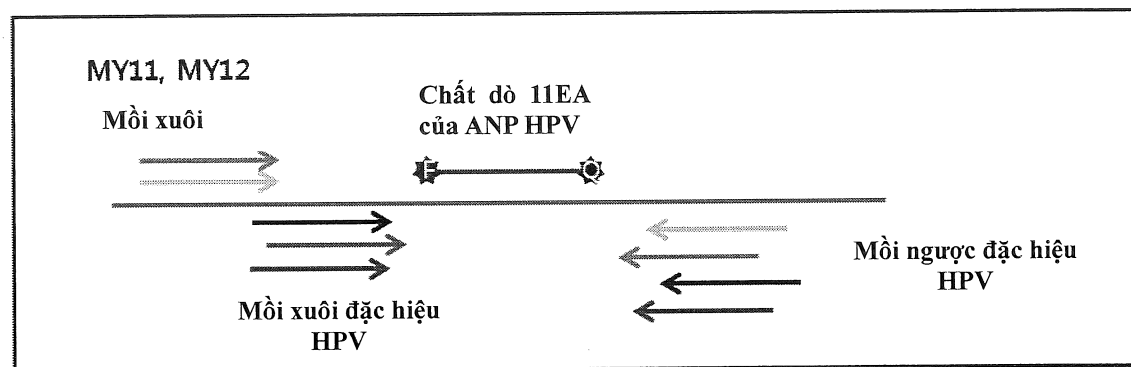
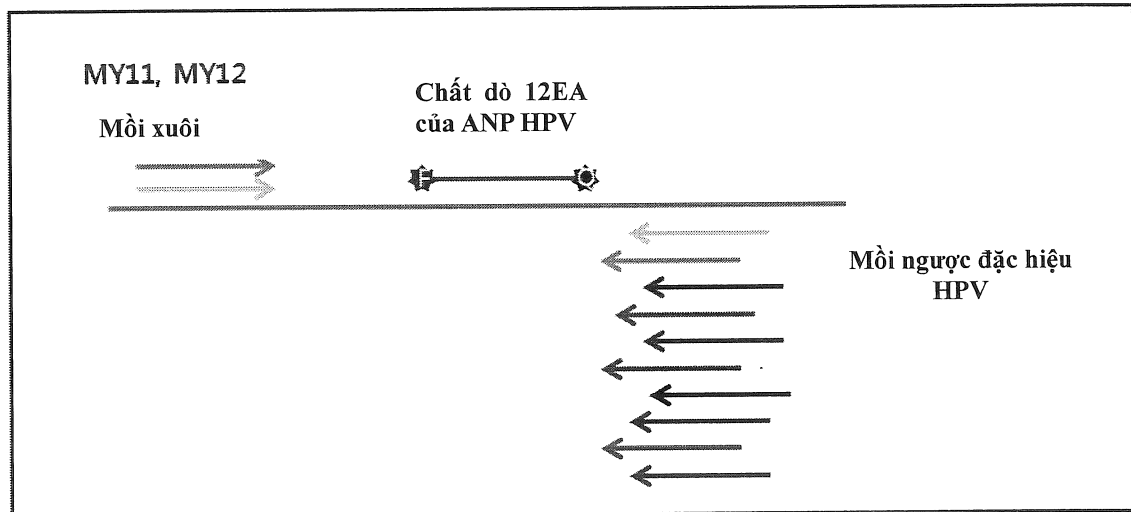
- (a) thực hiện sự lai hóa bằng cách trộn chất dò phát hiện và đoạn mồi trong mẫu mà chứa axit nucleic đích để thu được đường cong khuếch đại thời gian thực;
- (b) thu đường cong nóng chảy giữa sản phẩm được khuếch đại và chất dò phát hiện với sự thay đổi nhiệt độ sau khi khuếch đại; và
- (c) phân tích đường cong khuếch đại thời gian thực và đường cong nóng chảy riêng biệt thu được, lần lượt hoặc đồng thời.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó sự khuếch đại được thực hiện bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) thời gian thực.

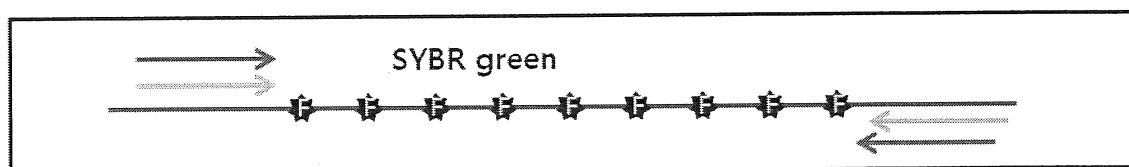
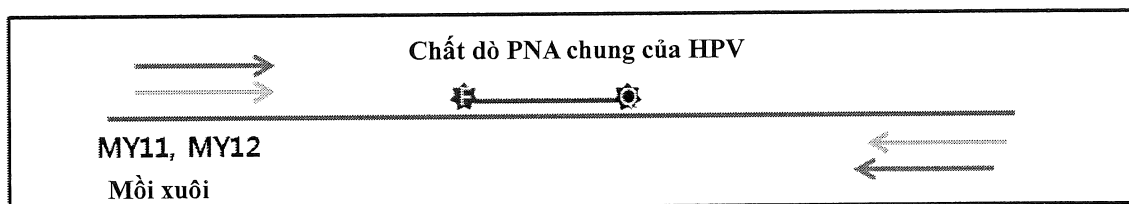
1/5

Fig. 1

1)



2)



2/5

3)

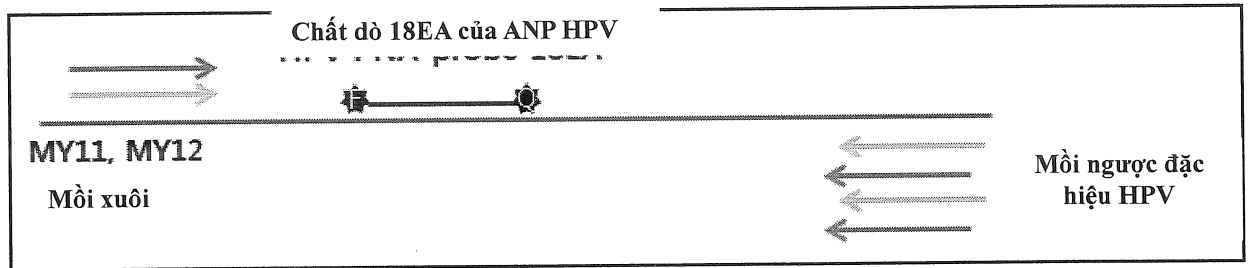
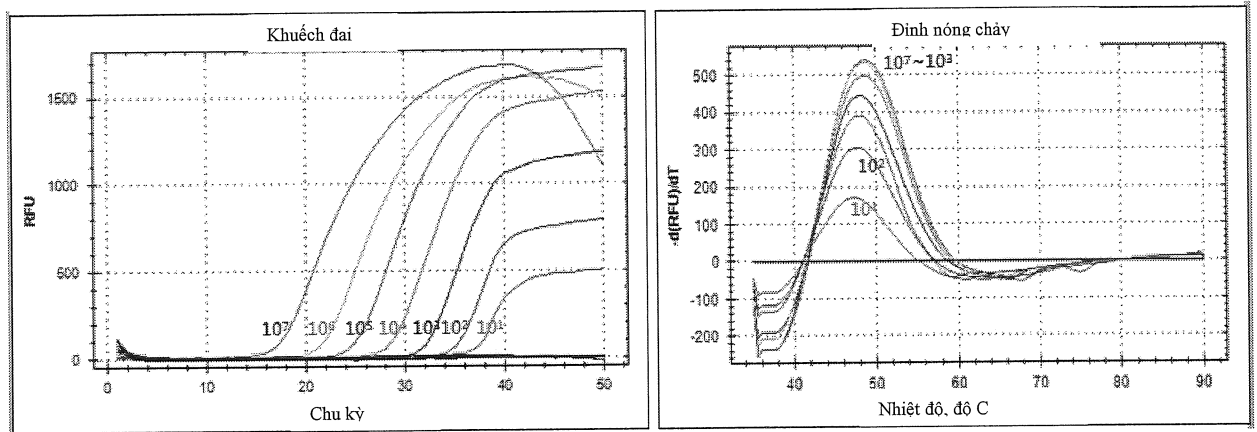
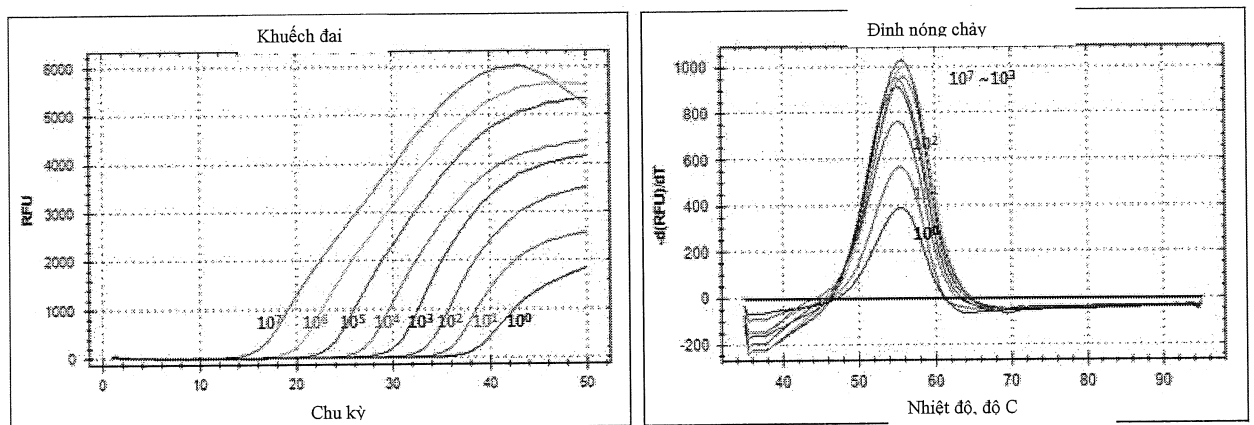


Fig. 2

Các đường cong khuếch đại và đỉnh nóng chảy của kiểu gen HPV 16



Các đường cong khuếch đại và đỉnh nóng chảy của kiểu gen HPV 18



Các đường cong khuếch đại và đỉnh nóng chảy của kiểu gen HPV 52

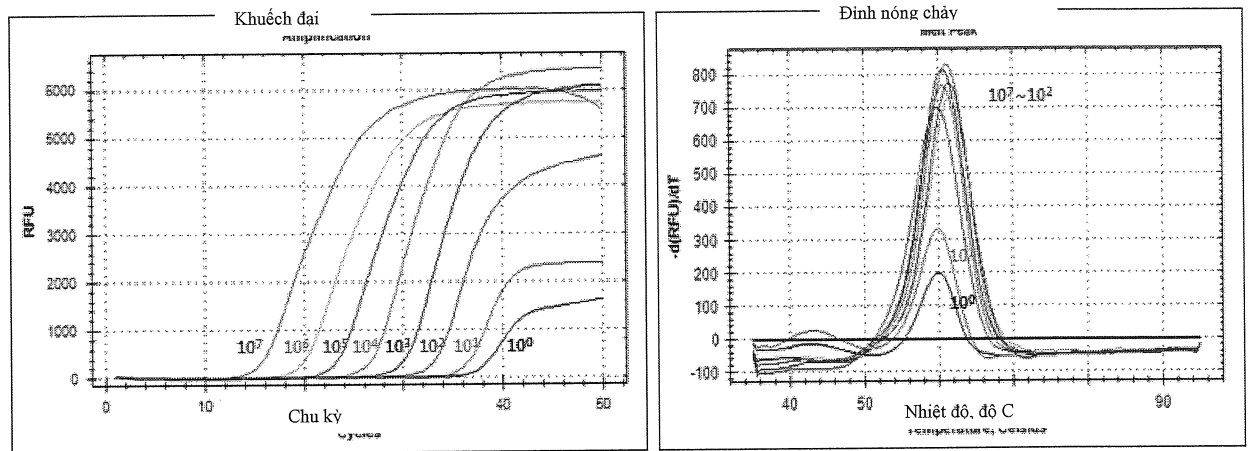
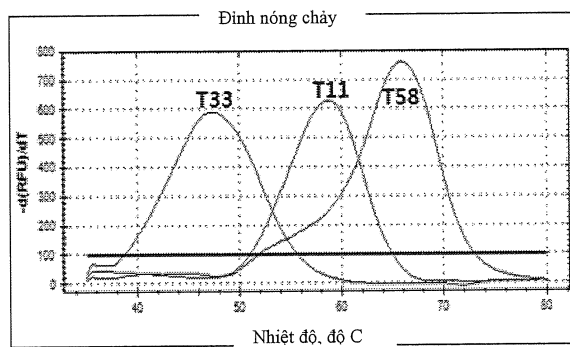


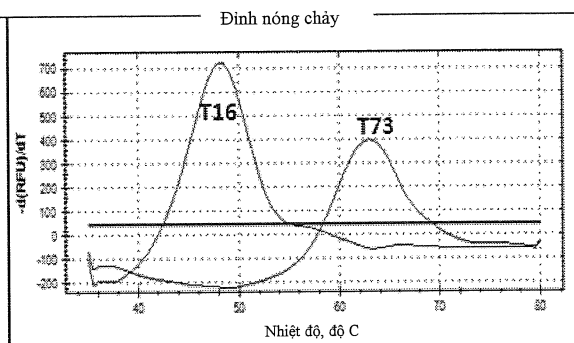
Fig. 3

Chất dò huỳnh quang ANP Real-Time PCR (Phân tích kiểu gen HPV)

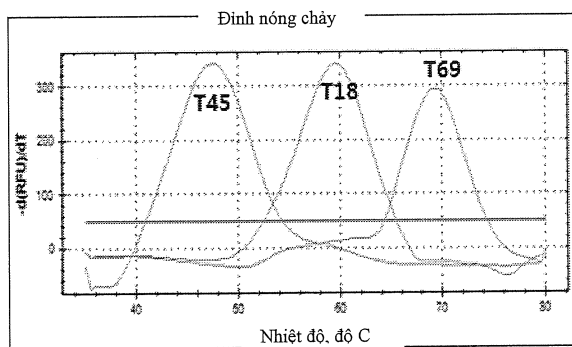
ANP đánh dấu FAM



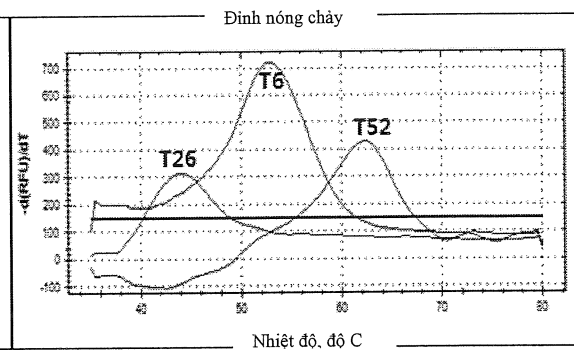
ANP đánh dấu HEX



ANP đánh dấu ROX



ANP đánh dấu CY5

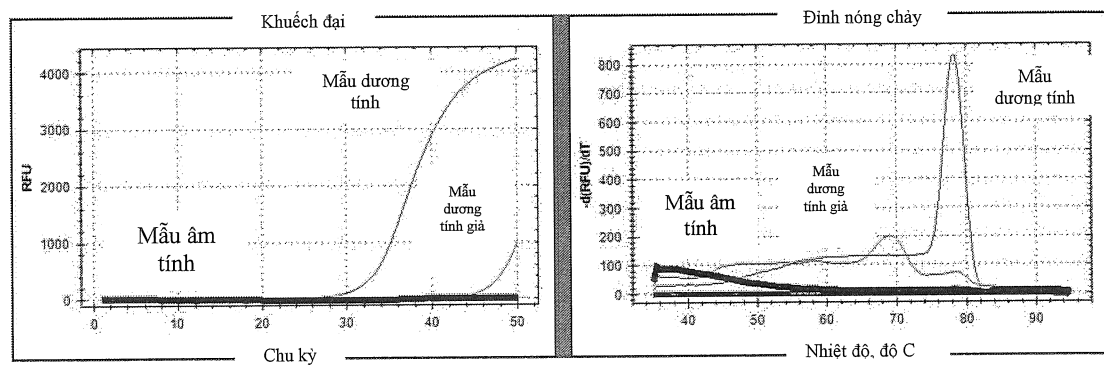


4/5

Fig. 4

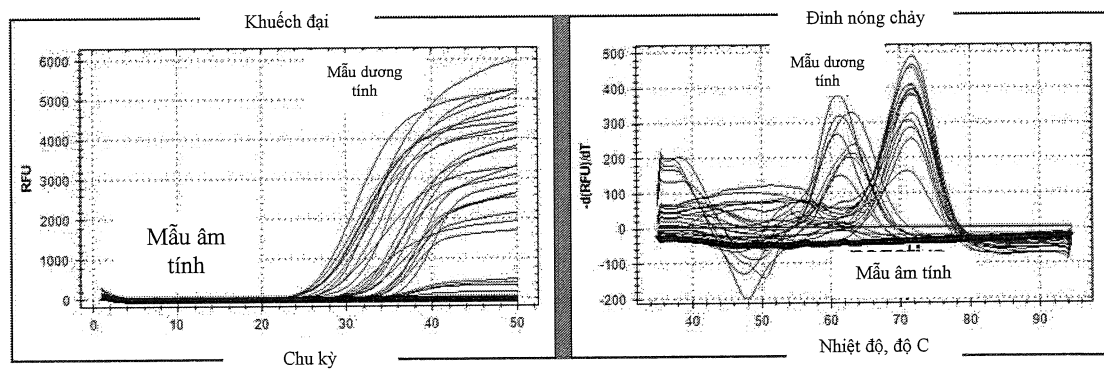
Real-Time PCR sử dụng SYBR Green (Xác định sự có mặt hoặc vắng mặt ADN của HPV theo sáng chế)

Biểu đồ thể hiện tính đặc hiệu phát hiện



Chất dò huỳnh quang ANP Real-Time PCR (Xác định sự có mặt hoặc vắng mặt ADN của HPV theo sáng chế)

Biểu đồ thể hiện tính đặc hiệu phát hiện

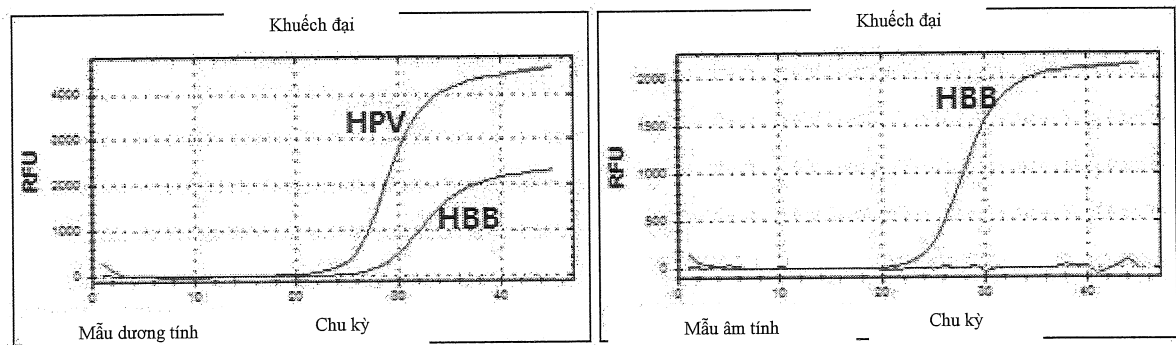


5/5

Fig. 5

Chất dò huỳnh quang ANP Real-Time PCR (Xác định sự có mặt hoặc vắng mặt ADN của HPV theo sáng chế)

Biểu đồ thể hiện tính đặc hiệu phát hiện



Danh mục trình tự

<110> PANAGENE INC.

<120> CHẤT DÒ AXIT NUCLEIC PEPTIT, KIT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN KIỂU GEN CỦA VIRUT PAPILOMA Ở NGƯỜI

<130> Y15KP-019

<150> KR 2014-0095050

<151> 2014-07-25

<160> 185

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (14)

<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 1
gcatccgtaa ctac
14

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> t ở vị trí 4 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (8)
<223> t ở vị trí 8 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (12)
<223> t ở vị trí 12 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcy1 được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 2
gcattccgtaa ctac
14

<210> 3
<211> 13
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> C_region
<222> (13)
<223> Cy5 được gắn ở đầu-C

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dab-k(Dab) được gắn ở đầu-N

<400> 3

catccgtaac tac
13

<210> 4
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcy1 được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 4
ctgtgtctaa atct
14

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (4)
<223> t ở vị trí 4 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (8)
<223> a ở vị trí 8 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
<221> N_region
<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (16)

<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 5

ctgtgtcaaa atctgc

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (16)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 6

ctgtgtctaa atctgc

16

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 7
ccacatctac ttcag
15

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (8)
<223> t ở vị trí 8 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (12)
<223> t ở vị trí 12 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 8
ccacatctac ttcag
15

<210> 9
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> c ở vị trí 6 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (11)
 <223> c ở vị trí 11 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (17)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 9
 gctgccatat ctacttc
 17

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)
<223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 10
acacagtctc ctgtacct
18

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)
<223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 11
gtctcctgta cctgggca
18

<210> 12
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region
<222> (14)
<223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 12
agtctcctgt acct
14

<210> 13
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 13
gcattctgcat ccac
14

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)

<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 14
agcatctgca tccactcc
18

<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 15
ttagtacatt atctag
16

<210> 16
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 16
gcacacaagt aact
14

<210> 17
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> t ở vị trí 10 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (14)
<223> t ở vị trí 14 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 17
gcacacaagt aact
14

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>

<221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (18)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 18
 caaaatcctg tgccaagt
 18

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (7)
 <223> t ở vị trí 7 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> t ở vị trí 10 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 19
 acaaaatcct gtgcc
 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (7)
 <223> t ở vị trí 7 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> t ở vị trí 10 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> DabcyI được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 20
 acaaaatcct gtgcc
 15

<210> 21
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> DabcyI được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region
 <222> (14)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 21
 ggaatacctt cgtc
 14

<210> 22
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> t ở vị trí 5 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (8)
 <223> t ở vị trí 8 được biến đổi thành axit D-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 22
 accttcgtca aggcg
 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> t ở vị trí 5 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (8)
<223> t ở vị trí 8 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 23
accttcgtca aggcg
15

<210> 24
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 24

gcactgaagt aactaag
17

<210> 25
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 25
ctgaagtaac taag
14

<210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 26
gcactgaagt aactaag
17

<210> 27
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 27
acaatctgca tctgcc
17

<210> 28
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 28
caatctgcat ctgccac
17

<210> 29
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (17)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 29
 caatctgcat ctgccac
 17

<210> 30
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 30
 caggctagta gctc
 14

<210> 31
 <211> 13

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (13)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 31
ctgtatgtgt agg
13

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

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 32
caggctagta gctc
14

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (18)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 33

gcaaacagtg atactaca

18

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (17)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 34

gcaaacagtg atactac

17

<210> 35

<211> 14

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> t ở vị trí 9 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> t ở vị trí 12 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> C_region

<222> (14)

<223> HEX được gắn ở đầu-C

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<400> 35

aacagtgata ctac

14

<210>

36

<211>

19

<212>

DNA

<213>

Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region
 <222> (19)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 36
 tgctgtgtct tctagtgc
 19

<210> 37
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 37
 tgctgtgtct tctagt
 16

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (19)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 38
tgctgtgtct tctagtgc
19

<210> 39
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 39
tatagagtct tccata
16

<210> 40
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> t ở vị trí 9 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<220>
 <221> modified_base
 <222> (13)
 <223> t ở vị trí 13 được biến đổi thành axit L-glutamic

<400> 40
 tagagtcttc cata
 14

<210> 41
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 41
 tcttccatac cttcta
 16

<210> 42
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (15)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 42

tgctgcggtt tcccc

15

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> a ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> modified_base

<222> (11)

<223> a ở vị trí 11 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (15)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 43
actgcagcag attcc
15

<210> 44
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 44
tttactccaa gtaa
14

<210> 45
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 45

tacatatataat tcaaag
16

<210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 46
ctacatatataa ttcaaag
17

<210> 47
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 47
acatatataatt caaag
15

<210> 48
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 48
 agtattgcta caga
 14

<210> 49
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 49
 agtactgcta cagaac
 16

<210> 50
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 50
 ctacagaaca gttaa
 15

<210> 51
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 51
 gcttctacta cttctt
 16

<210> 52
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PNA

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (4)
 <223> t ở vị trí 4 được biến đổi thành axit L-glutamic

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> t ở vị trí 9 được biến đổi thành axit L-glutamic

 <220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> DabcyI được gắn ở đầu-N

 <220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

 <400> 52
 gcttctacta cttctt
 16

 <210> 53
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PNA

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (4)
 <223> t ở vị trí 4 được biến đổi thành axit L-glutamic

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)

<223> t ở vị trí 9 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (16)

<223> HEX được gắn ở đầu-C

<400> 53

gcttctacta cttctt

16

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (16)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 54

caacatgact attaata

16

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> t ở vị trí 10 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (13)
 <223> t ở vị trí 13 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 55
 caacatgact attaat
 16

<210> 56
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)

<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 56
attaatgcag ctaa
14

<210> 57
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 57
tctactactg aatca
15

<210> 58
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> t ở vị trí 3 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 58
 tctactacta caga
 14

<210> 59
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> t ở vị trí 3 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> t ở vị trí 6 được biến đổi thành axit L-glutamic

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 59
 tctactacta caga
 14

<210> 60
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 60
 ctgctgtata tagcc
 15

<210> 61
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 61
 atagccctac aaagtt
 16

<210> 62
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> ROX được gắn ở đầu-C

<400> 62
 ctgctgtatt tagcc
 15

<210> 63
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (14)
 <223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 63
 taaccattag cact
 14

<210> 64
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 64
 cactgctgtt actcca
 16

<210> 65
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 65
 gcactgctgt tactc
 15

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 66

gcmcagggwc ataayaatgg
20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 67

ggacaggggc ayaayaatgg
20

<210> 68

<211> 27

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 68

tgcgtcatgt ggaagagtat gatttac
27

<210> 69

<211> 26

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 69

tgtaaatacat actcttccac atgacg
26

<210> 70

<211> 23

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 70
gaatacatgc gccatgtgga gga
23

<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 71
gcgcatgtat tccttataat ctga
24

<210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 72
actaacttta argagtacct acgaca
26

<210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 73
cytccccatg tcgtaggtac tc
22

<210> 74
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 74
ctaccaaatt taagcagtat agcaga
26

<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 75
tctgctatac tgcttaaatt tggtagcatc
30

<210> 76
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 76
gacatggcga agaatatgaa ttacaatt
28

<210> 77
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 77
tctgttgtaa gtgttat ttt acacaactg
29

<210> 78
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 78
catgttgaag aatatgatyt acagtttg
28

<210> 79
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 79
caaactgtar atcatattct tcaacatgtc
30

<210> 80
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 80
agtagacatg tggaggaata tgatttaca
29

<210> 81
<211> 22
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 81

ctccacatgt ctactatact gc
22

<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 82
tacaatttat ttttcaattg tgcaara
27

<210> 83
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 83
agcygttaat gtaatyttgc acaattga
28

<210> 84
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 84
atggtgaaga rtatgactta cagtttggt
29

<210> 85
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 85
aacaaactgt aagtcatayt cttcaacat
29

<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 86
cagtttataa ggcattggtga g
21

<210> 87
<211> 23
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 87
tcctcaccat gccttataaa ctg
23

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 88
agacatgcag aagagtttga tttacag
27

<210> 89
<211> 36
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 89
tagtagaatt catagaatgt atatatgtca ttacct
36

<210> 90
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 90
gacatgggtga ggaattygat ttacaatt
28

<210> 91
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 91
craattcctc accatgtcct aaatac
26

<210> 92
<211> 29
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 92
cttctaagtt taaggaatat accaggcac
29

<210> 93
<211> 22
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 93

cttcacccatg ccttaaatat tc
22

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 94

gacatggtga agaatatgat ytacagtttg
30

<210> 95

<211> 28

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 95

cgtgcctggt atattcctta aacttaga
28

<210> 96

<211> 28

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 96

gaatatattaa ggcacgtgga agaatatg
28

<210> 97

<211> 28

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 97
ctaatatatt gcttaaagtt acttggag
28

<210> 98
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 98
catgcagagg aatatgaatt acaatttg
28

<210> 99
<211> 25
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 99
attcctctgc atgyctaaca tactg
25

<210> 100
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 100
atcagtacct tagacatgtg gaggartatg
30

<210> 101
<211> 23
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 101
ctccacatgt ctaaggtact gat
23

<210> 102
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 102
cagttttaaa gaatatgcca gacatg
26

<210> 103
<211> 23
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 103
gtctggcata ttctttaaaa ctg
23

<210> 104
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 104
tgaaatcaat caataccttc gccatgtg
28

<210> 105
<211> 25
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 105
catggcgaag gtattgattg atttc
25

<210> 106
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 106
ttaggcatgt tgaggaatat gatttgc
27

<210> 107
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 107
caaatcatat tcctcaacat gcctaac
27

<210> 108
<211> 25
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 108

gcatgtggag gaatatgatt tacaa
25

<210> 109
<211> 22
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 109
tccacatgcc tagtatattc ct
22

<210> 110
<211> 28
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 110
caatttatat ttcaattgtg taaaatca
28

<210> 111
<211> 23
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 111
tagaatccat ggtgtgcagg taa
23

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 112
tgattttacag tttattttttc
20

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 113
cgtccmarrg gawactgatc
20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<400> 114
tttggttactg tggtagatac
20

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<400> 115
tttggttacag ttgtggatac
20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<400> 116
tttgtaactg ttgtagatac
20

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<400> 117
tttattacct gtgttgatac
20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<400> 118
tttgtaactg ttgtggatac
20

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<400> 119
tttttaactg tggtagacac
20

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<400> 120

tttattactt gtgttgacac
20

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<400> 121

tttgtcacgg tggtagatac
20

<210> 122

<211> 17

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mồi

<400> 122

cagggccaca ataatgg
17

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mồi

<400> 123

gcgcagggcc acaataatgg
20

<210> 124

<211> 15

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 124
gcgcaaggcc acaat
15

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 125
gcgcaaggcc acaataatgg
20

<210> 126
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 126
cccagggcca caataat
17

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 127
gcccagggcc acaataatgg
20

<210> 128
<211> 19
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 128
catttgcttc tgacacaac
19

<210> 129
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 129
gcttacattt gcttctgaca caac
24

<210> 130
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 130
ctgtaattca tattcctc
18

<210> 131
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 131
ctgtaattca tattcctcta catgtc
26

<210> 132
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 132
gcacatcata ttcttcagca
20

<210> 133
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 133
gcacatcata ttcttcagca tgtc
24

<210> 134
<211> 20
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 134
aaatcaaact cctctgtatg
20

<210> 135
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 135

tggcaaatca aactcctctg tatggc
26

<210> 136
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 136
aaatcaaatt cctccg
16

<210> 137
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 137
gcaaatcaaa ttccctccgtg tgtc
24

<210> 138
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 138
tcatattcct ctgtgtg
17

<210> 139
<211> 26
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 139
gtaagtcata ttcctctgtg tggcgg
26

<210> 140
<211> 19
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 140
catccacggtt caccttgcc
19

<210> 141
<211> 21
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<400> 141
ttcatccaag ttcaccttgc c
21

<210> 142
<211> 24
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<220>
<221> đột biến
<222> (7)
<223> n ở vị trí 7 là Inosin

<220>
<221> đột biến
<222> (20)..(21)
<223> n ở vị trí 20 và 21 là Inosin

<400> 142
 aytgyanktc awaytcytcn ncat
 24

<210> 143
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<220>
 <221> đột biến
 <222> (9)
 <223> n ở vị trí 9 là Inosin

<220>
 <221> đột biến
 <222> (22)..(23)
 <223> n ở vị trí 22 và 23 là Inosin

<400> 143
 aaaytgyank tcawaytcyt cnncatg
 27

<210> 144
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<220>
 <221> đột biến
 <222> (20)..(21)
 <223> n ở vị trí 20 và 21 là Inosin

<400> 144
 aytgyaadtc awaytcytcn nc
 22

<210> 145
 <211> 27

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<220>
<221> đột biến
<222> (22)..(23)
<223> n ở vị trí 22 và 23 là Inosin

<400> 145
aaaytgyaad tcawaytcyt cnncatg
27

<210> 146
<211> 23
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<220>
<221> đột biến
<222> (18)..(19)
<223> n ở vị trí 18 và 19 là Inosin

<400> 146
tgyaaatcaw aytcytcnnc atg
23

<210> 147
<211> 27
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mỗi

<220>
<221> đột biến
<222> (22)..(23)
<223> n ở vị trí 22 và 23 là Inosin

<400> 147

aaaytgyaaa tcawaytcyt cnncatg
27

<210> 148
<211> 19
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (19)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 148
ccacacaaac gttatccac
19

<210> 149
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<400> 149
ccacacaaac gttatcc
17

<210> 150
<211> 19
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (19)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 150
tactgtaaca actgaagac
19

<210> 151
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 151
ctactgtaac aactgaag
18

<210> 152
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (20)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 152
 caatccacaa gtacaactgc
 20

<210> 153
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (17)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 153
 gtaggtacac aatccac
 17

<210> 154
 <211> 14

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 154
acaccaaccc cata
14

<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 155
ccacaccaac cccatata
18

<210> 156
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (17)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 156

tgcaacatct ggtgata

17

<210> 157

<211> 19

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (19)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 157

ctgcaacatc tgggtgatac

19

<210> 158

<211> 19

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (19)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 158

ctctactgac cctactgtg

19

<210> 159

<211> 17

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (17)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 159

ctctactgac cctactg

17

<210> 160

<211> 15

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 160
cacagtcccc tccgt
15

<210> 161
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 161
tacacagtcc cctccgt
17

<210> 162
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>

<221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 162
 tccacgcagg atagc
 15

<210> 163
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (20)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 163
 cagcatccac gcaggatagc
 20

<210> 164
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (16)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 164

caactcagtc tccatc

16

<210> 165

<211> 14

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (14)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 165

caactcagtc tcca

14

<210> 166

<211> 16

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 166
ccccctgta tctgaa
16

<210> 167
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 167
cctgtatctg aata
14

<210> 168
<211> 12
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region
 <222> (12)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 168
 ctgcagcaga at
 12

<210> 169
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (18)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 169
 cgcctccact gctgcagc
 18

<210> 170
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (12)

<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 170
atcagaggct ac
12

<210> 171
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 171
tcagaggcta cata
14

<210> 172
<211> 18
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (18)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 172
ctcacaatcg ctttctgc
18

<210> 173
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 173
cacaatcgcc ttctg
15

<210> 174
<211> 16
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 174

cagctacatc tgctgc
16

<210> 175
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 175
cagctacatc tgct
14

<210> 176
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (15)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 176
cagctgctgc tacac
15

<210> 177
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (13)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 177
 cagctgctgc tac
 13

<210> 178
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (15)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 178
 ccaccaccga atcag
 15

<210> 179
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (16)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 179
 caccaccgaa tcagaa
 16

<210> 180
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA

<220>
 <221> N_region
 <222> (1)
 <223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
 <221> C_region
 <222> (17)
 <223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 180
 cactcaaaca accactg
 17

<210> 181
 <211> 16

<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (16)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 181
ctcaaacaac cactga
16

<210> 182
<211> 14
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (14)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 182
accctctgac acat
14

<210> 183
<211> 12
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dabcyl được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (12)
<223> FAM được gắn ở đầu-C

<400> 183
cctctgacac at
12

<210> 184
<211> 17
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PNA

<220>
<221> N_region
<222> (1)
<223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>
<221> C_region
<222> (17)
<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 184
agtctgccgt tactgcc
17

<210> 185
<211> 15
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PNA

<220>

<221> N_region

<222> (1)

<223> Dab-K(Dab) được gắn ở đầu-N

<220>

<221> C_region

<222> (15)

<223> CY5 được gắn ở đầu-C

<400> 185

gtctgccggtt actgc

15