



(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)



1-0054023

(51)^{2020.01} C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2021-02498

(22) 06/05/2021

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/07/2021 400A

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Vân Anh (VN); Chu Văn Sơn (VN); Nguyễn Văn Liệu (VN).

(54) KIT ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI GEN KHÁNG NGUYÊN BẠCH CẦU NGƯỜI
GÂY DỊ ỨNG THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐỘNG KINH HLA-A*31:01 VÀ HLA-
B*15:02 VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KIT NÀY

(21) 1-2021-02498

(57) Sáng chế đề cập đến kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 và quy trình sản xuất kit này. Kit theo sáng chế cho phép phát hiện alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 của gen HLA trong mẫu bằng kỹ thuật real time-PCR. Bằng cách tối ưu các đoạn mồi, đoạn dò, các trình tự đối chứng thuộc gen HLA, kit theo sáng chế cho phép phát hiện đặc hiệu alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 gây dị ứng thuốc chỉ bằng một phản ứng duy nhất với kết quả rõ nét, hạn chế được tình trạng âm tính, dương tính giả, hỗ trợ hiệu quả công tác chẩn đoán, tiên lượng nguy cơ dị ứng kháng thuốc cho các bệnh nhân sử dụng thuốc điều trị bệnh động kinh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh, cụ thể là đề cập đến kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bằng kỹ thuật real time-PCR và quy trình sản xuất kit này. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất kit theo sáng chế để phát hiện sự có mặt của alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 trong mẫu ADN người hỗ trợ hiệu quả công tác chẩn đoán, tiên lượng nguy cơ dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh, như là carbamazepin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Carbamazepin (CBZ) với tên thương mại Tegretol® là thuốc đầu tay trong điều trị bệnh động kinh và các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra mối liên quan chặt chẽ giữa những người mang alen HLA-B*15:02 ở người châu Á và alen HLA-A*31:01 ở người châu Âu và Nhật Bản với hiện tượng dị ứng thuốc này, bao gồm các trường hợp gây tử vong do hội chứng Steven-Johnson (SJS), hội chứng Lyell (Toxic Epiderma Necrolysis, TEN). Để giảm nguy cơ tử vong và bệnh tật do dị ứng thuốc CBZ, năm 2007 Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã khuyến cáo kiểm tra sự có mặt của HLA-B*15:02 trước khi kê đơn CBZ điều trị động kinh cho những bệnh nhân gốc Á và ghi nhận mối liên quan chặt chẽ của alen HLA-A*31:01 với các phản ứng dị ứng nặng trên da ở bệnh nhân gốc Âu và Nhật Bản. Tổ chức thực hành lâm sàng Dược di truyền (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium – CPIC) khuyến cáo bệnh nhân mang alen HLA-A*31:01 hoặc/ và HLA-B*15:02 không nên sử dụng liệu pháp liên quan đến carbamazepin.

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu phát triển phương pháp phát hiện alen HLA-A*31:01/ HLA-B*15:02, hầu hết đều theo nguyên lý nhân bản gen với cặp mồi đặc hiệu cho các alen (PCR- sequence specific primer/ PCR- SSP) để phát hiện từng alen được công bố như kỹ thuật nhân bản gen ở điều kiện đẳng nhiệt LAMP PCR (Cheng và cộng sự, 2009), nhân bản gen lồng nested PCR (Virakul và cộng sự 2012). Các phương pháp trên đòi hỏi kỹ thuật viên trải qua hai công đoạn là nhân bản gen bằng phản ứng PCR

sau đó thực hiện điện di để kiểm tra sự có mặt của sản phẩm khuếch đại gen HLA. Điều này vừa phức tạp vừa tốn thời gian và độ chính xác chưa cao. Trong nghiên cứu của Cheng và cộng sự (Cheng SH, Kwan P, Nguyen HK, et al. (2009) New Testing Approach in HLA Genotyping Helps Overcome Barriers in Effective Clinical Practice. *Clinical Chemistry* 55, 1568-1572) cho thấy có hiện tượng dương tính giả khi một cá thể mang gen dị hợp của alen HLA-B*15:25/ 15:15. Nghiên cứu của Virakul và cộng sự (Virakul S, Kupatawintu P, Nakkuntod J, et al. (2012) A nested sequence-specific primer-polymerase chain reaction for the detection of HLA-B*15:02. *Tissue Antigens* 79, 295-301) cho thấy không thể phân biệt được alen HLA-B*15:02 với các alen thuộc nhóm alen HLA-B*15. Do đó, một nhược điểm về mặt kỹ thuật đó là với các phương pháp hiện có, không thể phân biệt được các alen có mặt trong một cá thể dị hợp tử. Gần đây Nguyen và cộng sự (2017) đã phát triển kỹ thuật real time PCR sử dụng đầu dò Taqman (Taqman probe) để nhân bản chọn lọc HLA-B*15:02 và HLA-A*31:01 với ưu điểm thời gian ngắn và độ chính xác tương đối cao (Nguyen DV, Vidal C, Chu HC, et al. (2017) A novel multiplex polymerase chain reaction assay for detection of both HLA-A*31:01/HLA-B*15:02 alleles, which confer susceptibility to carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions. *HLA* 90, 335-34). Tuy nhiên, các đoạn mồi và các đoạn dò được thiết kế chưa tối ưu, do đó không thể phân biệt được các alen HLA-A*30 với alen HLA-A*31:01 trong một mẫu. Nghiên cứu này được thực hiện tại trường Đại học Sydney (Úc) và chưa thấy được ứng dụng trong phát triển kit dùng để phát hiện đồng thời alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 tại Việt Nam.

Trên thị trường hiện đang lưu hành kit sàng lọc alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 sử dụng kỹ thuật real time-PCR SYBR Green là HLA-A*31:01 Detection và HLA-B*1502 Detection của hãng Pharmigene (Đài Loan) có chứng nhận *In vitro* diagnostic- IVD (Đài Loan, Trung Quốc) và Analyte Specific Reagent-ARS (Hoa Kỳ). Kit sử dụng kỹ thuật real time-PCR sử dụng chất huỳnh quang SYBR Green với giá thành xét nghiệm cao (hiện đang được thương mại hóa tới 1,5 triệu/1 loại alen, 3 triệu cho HLA-A*31:01/ HLA-B*15:02 theo giá thành năm 2021), và đòi hỏi bước phân tích về giá trị chu kỳ ngưỡng khá phức tạp giữa 2 ống phản ứng/xét nghiệm. SYBR® Green là thuốc nhuộm đặc hiệu ADN sợi đôi, nhược điểm chính của phương pháp phát hiện này là đòi hỏi kỹ thuật viên phải phân tích thêm nhiệt độ nóng chảy (Melting curve analysis) để xác định chính xác tín hiệu dương tính của mẫu xét nghiệm và các tín hiệu

chất nền SYBR, với những nhược điểm nêu trên dẫn đến kỹ thuật viên phải thao tác phức tạp với 1 mẫu xét nghiệm khó thực hiện thường quy với số mẫu xét nghiệm lớn. Kit HLA-A3101 RealFast™ Assay và HLA-B1502 RealFast™ Assay của hãng ViennaLab (Úc) dựa trên nền real time-PCR với đầu dò Taqman thông thường có chứng chỉ CE-IVD, tuy nhiên không thể phát hiện đồng thời cả 2 alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 trong cùng 1 ống phản ứng.

Kit thương mại LIFECODES HLA-A/B SSO Typing sử dụng công nghệ khác là PCR-SSO, không phải real time-PCR. Kit của hãng IMMUCOR® (Hoa Kỳ) cho phép phát hiện các locus HLA-A và HLA-B có chứng chỉ CE/IVD cho chẩn đoán xét nghiệm lâm sàng phân tích bằng hệ thống Luminex (Luminex xMAP technology). Tuy nhiên kit này có giá thành cao, cần thiết bị và phần mềm vận hành phức tạp, khó áp dụng rộng rãi trong nhiều cơ sở y tế và cần chi phí lớn để trang bị hệ thống Luminex. Một số bộ kit định typ HLA sử dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới kit Nextera XT của Illumina với chi phí vận hành hệ thống và hóa chất đắt tiền, khó áp dụng thường quy tại các phòng xét nghiệm cơ bản.

Do đó, vẫn có nhu cầu tạo ra kit cho phép phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh đặc trưng bởi sự có mặt của hai alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02. Kit này cần đặc hiệu cho phép phát hiện đồng thời cả hai alen trong một phản ứng real time-PCR giúp rút ngắn thời gian, giảm giá thành, đơn giản trong sử dụng và có độ đặc hiệu, độ nhạy cao cho phép hỗ trợ sàng lọc giúp bác sĩ lâm sàng có được cơ sở trong việc chỉ định sử dụng thuốc carbamazepin (CBZ) trong điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh động kinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, theo đó sáng chế đề xuất kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 và quy trình sản xuất kit này. Bằng cách thiết kế các đoạn mồi, đoạn dò đặc hiệu huỳnh quang có các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) cùng với việc tối ưu hóa các điều kiện thực hiện, kit theo sáng chế cho phép thực hiện real time-PCR đa mồi cho phép phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 chỉ bằng một phản ứng PCR duy nhất.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bao gồm các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, trong đó:

+ dung dịch phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chứa:

- cặp mỗi HLA-A*31:01 bao gồm mỗi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10; và mỗi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20;

- đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp mỗi HLA-B*15:02 bao gồm mỗi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40; và mỗi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50;

- đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.51-60, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp mỗi beta-actin có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62; và

- đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

+ đối chứng dương bao gồm dung dịch chứa các plasmit có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:

- plasmit PC3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64;

- plasmit PC1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65;

- plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66; và

+ đối chứng âm bao gồm dung dịch chứa các plasmit có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:

- plasmit NC1_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67;

- plasmit NC2_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68;

- plasmit NC3_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69;

- plasmit NC1_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.70;

- plasmit NC2_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71;

và

- plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thành phần dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương được đựng trong các lọ chứa độc lập và được đóng gói kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó đầu dò đầu dò HLA-A*31:01 được gắn chất phát huỳnh quang khác nhóm với đầu dò HLA-B*15:02. Theo một phương án cụ thể, đầu dò HLA-A*31:01 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5' và đầu dò HLA-B*15:02 được gắn chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 -

carboxy - 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' hoặc ngược lại.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kit theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo các plasmit tái tổ hợp bằng cách chèn lần lượt trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71 vào plasmit, sau khi biến nạp vào tế bào *E.coli*, nuôi cấy và chiết tách tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71 ký hiệu PC3101, PC1502, IC-actin, NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502, NC2_1502, tương ứng;

b) tổng hợp và chuẩn độ mỗi đoạn mồi bằng cách tổng hợp nhân tạo và chuẩn độ mỗi đoạn mồi đến nồng độ 100 pmol/μl, trong đó:

- cặp mồi HLA-A*31:01 bao gồm mồi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.1-10; và mồi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.11-20;

- cặp mồi HLA-B*15:02 bao gồm mồi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.31-40; và mồi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.41-50;

- cặp mồi beta-actin bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62;

c) tổng hợp và chuẩn độ các đoạn dò bằng cách tổng hợp nhân tạo, gắn đầu huỳnh quang và chuẩn độ mỗi đoạn dò đến nồng độ 10 pmol/μl, trong đó:

- đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.21-30 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.51-60 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy -

2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63 được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

d) thu kit bằng cách phối trộn các thành phần thu được với nước khử proteaza hoặc dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza để thu dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, trong đó:

+ dung dịch phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chứa:

- cặp mồi HLA-A*31:01 với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
- đầu dò HLA-A*31:01 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
- cặp mồi HLA-B*15:02 với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
- đầu dò HLA-B*15:02 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
- cặp mồi beta-actin với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl; và
- đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;

+ đối chứng dương bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau đến khi mỗi loại đạt nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:

- plasmit PC3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64;
- plasmit PC1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65;
- plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66; và

+ đối chứng âm bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:

- plasmit NC1_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67;
- plasmit NC2_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68;
- plasmit NC3_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69;

- plasmit NC1_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.70;
 - plasmit NC2_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71;
- và
- plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66.

sau khi trộn đều, thu được các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, mỗi dung dịch này được chứa trong các lọ chứa độc lập thu được kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó plasmit được sử dụng để tạo các plasmit tái tổ hợp PC3101, PC1502, IC-actin, NC1_3101, NC2_3101, NC1_1502 và NC2_1502 tái tổ hợp được chọn từ nhóm bao gồm plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quy trình này còn bao gồm bước đóng gói các lọ chứa dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương và kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các cặp môi để xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02, beta-actin có trong mẫu sinh học, trong đó:

Cặp môi cho alen HLA-A*31:01 gồm môi xuôi được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10, môi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20;

Cặp môi cho alen HLA-B*15:02 gồm môi xuôi được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40, môi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50;

Cặp môi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62.

Sáng chế còn đề cập đến các đầu dò để xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02 và beta-actin có trong mẫu sinh học, trong đó:

Đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

Đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.51-60, đầu dò này được gắn huỳnh quang 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), hoặc Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Sáng chế cũng đề cập đến các plasmit tái tổ hợp chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.64-71 để làm đối chứng âm và đối chứng dương trong xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02 và beta-actin có trong mẫu sinh học. Các plasmit tái tổ hợp này được chọn từ nhóm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.67-71.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại với đường nét liền là tín hiệu FAM (đặc trưng cho HLA-B*15:02); đường nét chấm là tín hiệu HEX (đặc trưng cho HLA-A*31:01) và đường gạch chấm là tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho beta-actin nội chuẩn) của mẫu đối chứng dương, đối chứng âm của kit theo sáng chế.

Hình 2 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho HLA-B*15:02), tín hiệu HEX (đặc trưng cho HLA-A*31:01) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho beta-actin) của mẫu ADN tham chiếu mang HLA-A*31:01/33:01 và HLA-B*15:02/58:01.

Hình 3 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc trưng cho HLA-B*15:02) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho beta-actin) của mẫu ADN tham chiếu mang HLA-A*02:01/02:06 và HLA-B*15:02/15:25.

Hình 4 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu HEX (đặc trưng cho HLA-A*31:01) và tín hiệu Texas Red (đặc trưng cho beta-actin) của mẫu ADN tham chiếu mang HLA-A*02:01/31:01 và HLA-B*46:01/58:01.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Kit theo sáng chế được phát triển trên kỹ thuật PCR với các thành phần chung như dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza là các thành phần được sử dụng chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành hoặc được cung cấp bởi các nhà cung cấp hóa chất trên thị trường. Các thành phần này, trừ khi có quy định cụ thể khác, là những thành phần đã biết bất kỳ đáp ứng các tiêu chuẩn trong kỹ thuật PCR. Ví dụ, (i) dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza có thể mua được từ các nhà công ty như Qiagen (Hoa Kỳ), Promega (Hoa Kỳ), Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ), Enzymonics (Hàn Quốc); (ii) các chất phát huỳnh quang được gắn vào đầu 5' của các trình tự axit nucleic làm đầu dò bao gồm: Fluorescein amidit (FAM), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexafluorofluorescein (HEX), 5'-Tetrafluorofluorescein (TET), 6-carboxy-4',5'-dicloro-2',7'-dimethoxyfluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), Yakima yellow phosphoramidit (Yellow555), 6-carboxy-X-rhodamin (ROX), sulforhodamin 101 axit clorit (Texas Red), Fluor Red 610 Amidit (Red610), Cyanine-5 (Cy5), và chất hấp thụ huỳnh quang được gắn vào đầu 3' của các trình tự axit nucleic làm đầu dò bao gồm IBFQ (Iowa black fluorescence quencher) và BHQ1/2 (Black Hole Quencher 1 hoặc 2) có thể được mua từ IDT (Integrated DNA Technology, US). Ngoài ra, các đoạn mồi cũng như các đoạn dò và các trình tự đặc hiệu cho beta-actin, HLA-A*31:01, HLA-B*15:02, có thể được tổng hợp hóa học bởi các công ty sinh hóa theo đặt hàng như IDT (Hoa Kỳ), Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ) hoặc công ty Phù Sa Biochem (Việt Nam).

Các plasmit được sử dụng làm plasmit tái tổ hợp là plasmit thích hợp bất kỳ, có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.67-71. Ví dụ cụ

thể về plasmit ban đầu có thể được sử dụng là plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2 thương mại sử dụng trong nhân dòng, biến nạp gen đã biết và được bán trên thị trường dưới dạng kit thương mại. Ví dụ, plasmit pUC19 là vector được tạo ra bởi Joachim Messing và cộng sự là dạng ADN sợi kép hình tròn có 2686 cặp bazơ. pUC19 có đoạn đầu N của gen β -galactosidaza (lacZ) của *E. coli* gồm nhiều vị trí cắt enzym giới hạn HindIII, SphI, PstI, Sali, XbaI, BamHI, SmaI, KpnI, SACI và EcoRI và gen kháng ampicillin (mp R) cho phép biến nạp vào *E.coli* và chọn lọc trên môi trường thạch chứa ampicilin bổ sung IPTG và X-gal với khuẩn lạc màu trắng.

Theo sáng chế, thuật ngữ axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) còn được gọi là axit nucleic không thể tiếp cận, đây là một dạng đồng đẳng của axit nucleic, trong đó gốc riboza của axit nucleic được bổ sung thêm một liên kết 2'oxy và 4'cacbon. Axit nucleic dạng cầu khóa là nucleitit có liên kết 2'-O,4'-C-methylene-beta-D-ribofuranosyl (Birte Vester and Jesper Wengel, Biochemistry Volume 43, Number 42 October 26, 2004). Các trình tự axit nucleic chứa axit nucleic dạng cầu khóa mang đầy đủ tính bắt cặp Watson-Crick của axit nucleic thông thường, ngoài ra các trình tự chứa axit nucleic dạng cầu khóa này có đặc tính gắn kết rất đặc hiệu với các chuỗi ADN hoặc ARN bổ sung và các dạng lai hóa LNA/ADN hoặc LNA/ARN này rất bền với nhiệt (Birte Vester, and Jesper Wengel, Biochemistry Volume 43, Number 42 October 26, 2004). Ngược lại các lai hóa LNA/ADN hoặc LNA/ARN sẽ rất kém bền nếu trình tự LNA khác biệt so với các trình tự ADN hoặc ARN mà nó bắt cặp.

Trừ khi có quy định khác, theo sáng chế, để phân biệt axit nucleic thông thường với axit nucleic dạng cầu khóa, các ký hiệu 'A', 'G', 'C' và 'T' được sử dụng trong trình tự chỉ các axit nucleic dạng cầu khóa, nghĩa là các đồng phân của A, G, C và T tương ứng có liên kết 2'-O,4'-C-methylene-beta-D-ribofuranosyl.

Các đầu dò huỳnh quang được sử dụng theo sáng chế được thiết kế dựa trên trình tự đặc hiệu của alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02. Ví dụ, đầu 5' của mẫu dò có gắn chất phát huỳnh quang FAM, HEX, Texas Red, hoặc Cy5 với các bước sóng kích thích/phát xạ tương ứng là 495/520 nm; 540/570 nm; 580/604 nm; 650/670 nm, có thể phân biệt độc lập trên 4 kênh màu huỳnh quang của máy PCR định lượng; trong khi đó đầu 3' của các mẫu dò có gắn IBFQ là chất hấp thụ được cả 4 loại huỳnh quang này và không phát ra tín hiệu. Ngoài ra, đầu dò theo sáng chế được thiết kế với các axit nucleic dạng cầu khóa (Locked- nucleic acid: LNA), nêu trên cho phép tăng ái lực liên kết của

đầu dò với trình tự ADN đích, vừa giúp giảm độ dài đầu dò khiến khoảng cách giữa các đầu phát huỳnh quang và đầu dập tắt huỳnh quang thu hẹp giúp giảm nhiễu và tăng độ nhạy cho phản ứng real- time PCR đa môi của kit theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bao gồm các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm.

Dung dịch phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, trong dung dịch này còn chứa cặp môi HLA-A*31:01, đầu dò HLA-A*31:01, cặp môi HLA-B*15:02, đầu dò HLA-B*15:02, cặp môi beta-actin và đầu dò beta-actin.

Cặp môi HLA-A*31:01 được thiết kế dựa trên trình tự HLA-A*31:01 được chỉnh sửa tối ưu dựa trên alen HLA-A*31:01 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64. Cặp môi HLA-A*31:01 bao gồm môi xuôi được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10 và môi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20 trong bảng sau:

Môi xuôi HLA-A*31:01	Số trình tự
CTCCATGAGGTATTTTCAC	SEQ ID NO.1
ACTCCATGAGGTATTTTCAC	SEQ ID NO.2
CCACTCCATGAGGTATTTTCAC	SEQ ID NO.3
CCACTCCATGAGGTATATCAC	SEQ ID NO.4
CCACTCCATGAGGTATCTCAC	SEQ ID NO.5
CCACTCCATGAGGTATGTCAC	SEQ ID NO.6
CACTCCATGAGGTATTTTCACC	SEQ ID NO.7
CTCCATGAGGTATTTTCACC	SEQ ID NO.8
ACTCCATGAGGTATTTTCACC	SEQ ID NO.9
CCACTCCATGAGGTATTTTCACC	SEQ ID NO.10
Môi ngược HLA-A*31:01	Số trình tự
ACTCGGTCAATCTGTGAG	SEQ ID NO.11
CACTCGGTCAATCTGTGAG	SEQ ID NO.12
CCACTCGGTCAATCTGTGAG	SEQ ID NO.13
CCACTCGGTCAATCTGTGAGT	SEQ ID NO.14
CCACTCGGTCAATCTGTGAGTG	SEQ ID NO.15
CAGGTCCACTCGGTCA	SEQ ID NO.16

CCAGGTCCACTCGGTCA	SEQ ID NO.17
CCAGGTCCACTCGGTCAA	SEQ ID NO.18
CCCAGGTCCACTCGGTCA	SEQ ID NO.19
CCCAGGTCCACTCGGTCAA	SEQ ID NO.20

Cặp mồi HLA-A*31:01 cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen HLA-A*31:01 của người có kích thước nằm trong khoảng từ 219-231 bp. Nồng độ đoạn mồi xuôi và mồi ngược độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/ μ l.

Đầu dò HLA-A*31:01 được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen HLA-A*31:01 của người và được thiết kế với các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) với gốc riboza của axit nucleic được bổ sung thêm một liên kết 2'oxy và 4'cacbon cho phép gắn kết rất đặc hiệu với các chuỗi ADN bổ sung và dạng lai hóa LNA/ADN này bền với nhiệt nên cho phép tạo ra các liên kết bền tại các vị trí có trình tự bổ sung hoàn toàn với trình tự đầu dò HLA-A*31:01, nhưng kém bền với trình tự xuất hiện các vị trí không bổ sung hoàn toàn với đầu dò HLA-A*31:01. Hay nói cách khác, các đầu dò này cho phép gắn kết và tạo ra tín hiệu huỳnh quang với trình tự của gen HLA-A*31:01, nhưng không tạo ra tín hiệu huỳnh quang đối với những trình tự của các gen không phải là HLA-A*31:01. Nồng độ đầu dò HLA-A*31:01 trong mỗi phản ứng PCR có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/ μ l. Đầu dò HLA-A*31:01 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30 trong bảng sau:

Đầu dò HLA-A*31:01	Số trình tự	Vị trí LNA trong đầu dò
ACTC'AGG'CC'TCTCC	SEQ ID NO.21	5, 8 và 10
TACTC'AGG'CC'TCTCC	SEQ ID NO.22	6, 9 và 11
TACTC'AGG'CC'TCTCCT	SEQ ID NO.23	6, 9 và 11
TACTC'AGGCC'TCTCCT	SEQ ID NO.24	5 và 11
TACTC'AGG'CC'TC'TCCT	SEQ ID NO.25	6, 9, 11 và 13
TAC'TC'AGG'CC'TCTCCT	SEQ ID NO.26	4, 6, 9 và 11
TACTC'AGG'C'C'TCTCCT	SEQ ID NO.27	6, 9, 10 và 11
TACTC'AG'G'CC'TCTCCT	SEQ ID NO.28	6, 8, 9 và 11
TACTC'AGG'CC'T'CTCCT	SEQ ID NO.29	6, 9, 10 và 12
TACTCAGG'CC'TCTCCT	SEQ ID NO.30	9 và 11

Các đầu dò HLA-A*31:01 nêu trên chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) và được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát

huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) cho bước sóng phát xạ 520 nm khi bị kích thích ở bước sóng 495nm và có thể quan sát được trên kênh màu chuẩn tương ứng của thiết bị real time-PCR. Các chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) cho bước sóng phát xạ ở 556 nm khi bị kích thích ở bước sóng 535 nm và có thể quan sát được trên một kênh màu khác của thiết bị real time-PCR. Theo một phương án ưu tiên, đầu dò HLA-A*31:01 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM). Theo một phương án ưu tiên khác đầu dò HLA-A*31:01 được gắn chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) để thu được các kênh màu phát xạ tương ứng trên thiết bị real time-PCR.

Cặp mỗi HLA-B*15:02 được thiết kế dựa trên trình tự HLA-B*15:02 được chỉnh sửa tối ưu dựa trên alen HLA-B*15:02 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO.65. Cặp mỗi HLA-B*15:02 bao gồm mỗi xuôi được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40 và mỗi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50 trong bảng sau:

Mỗi xuôi HLA-B*15:02	Số trình tự
CGCGAGTCCGAGGTTGG	SEQ ID NO.31
CGCGAGTCCGAGGGTGG	SEQ ID NO.32
CGCGAGTCCGAGGCTGG	SEQ ID NO.33
CGCGAGTCCGAGGATGGC	SEQ ID NO.34
CGCGAGTCCGAGGTTGGC	SEQ ID NO.35
CGCGAGTCCGAGGGTGGC	SEQ ID NO.36
CGCGAGTCCGAGGCTGGC	SEQ ID NO.37
CGCGAGTCCGAGGATTGC	SEQ ID NO.38

CGCGAGTCCGAGGATAGC	SEQ ID NO.39
CGCGAGTCCGAGGATCGC	SEQ ID NO.40
Mỗi ngược HLA-B*15:02	Số trình tự
AGGTTCCGCAGGCTC	SEQ ID NO.41
AGGTTCCGCAGGCTCT	SEQ ID NO.42
AGGTTCCGCAGGCTCTC	SEQ ID NO.43
AGGTTCCGCAGGCTCTCT	SEQ ID NO.44
CAGGTTCCGCAGGCTCTCT	SEQ ID NO.45
AGGTTCCGCAGGCTCTCTC	SEQ ID NO.46
AGGTTCCGCAGGCTCTCTCG	SEQ ID NO.47
GGTTCCGCAGGCTCTCT	SEQ ID NO.48
GTTCCGCAGGCTCTCT	SEQ ID NO.49
TTCCGCAGGCTCTCT	SEQ ID NO.50

Cặp mỗi HLA-B*15:02 cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen HLA-B*15:02 của người có kích thước nằm trong khoảng từ 122-126 bp. Nồng độ đoạn mỗi xuôi và mỗi ngược này độc lập trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 20 pmol/μl.

Đầu dò HLA-B*15:02 được thiết kế dựa trên trình tự nucleic bắt cặp với trình tự gen HLA-B*15:02 của người và được thiết kế với các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) với gốc riboza của axit nucleic được bổ sung thêm một liên kết 2'oxy và 4'cacbon cho phép gắn kết rất đặc hiệu với các chuỗi ADN bổ sung và dạng lai hóa LNA/ADN này bền với nhiệt nên cho phép tạo ra các liên kết bền tại các vị trí có trình tự bổ sung hoàn toàn với trình tự đầu dò HLA-B*15:02, nhưng kém bền với trình tự xuất hiện các vị trí không bổ sung hoàn toàn với đầu dò HLA-B*15:02. Hay nói cách khác, các đầu dò này cho phép gắn kết và tạo ra tín hiệu huỳnh quang với trình tự của gen HLA-B*15:02, nhưng không tạo ra tín hiệu huỳnh quang đối với những trình tự của các gen không phải là HLA-B*15:02. Nồng độ đầu dò HLA-B*15:02 trong mỗi phản ứng PCR có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl. Đầu dò HLA-B*15:02 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30 trong bảng sau:

Đầu dò HLA-B*15:02	Số trình tự	Vị trí LNA trong đầu dò
GG'AA'CACACAGA'TC'TC	SEQ ID NO.51	3, 5, 13 và 15
CGG'AA'CACACAGA'TC'TC	SEQ ID NO.52	4, 6, 14 và 16
CGG'AA'CACACAGA'TC'TCC	SEQ ID NO.53	5, 8 và 10
CCGG'AA'CACACAGA'TC'TC	SEQ ID NO.54	5, 7, 15 và 17

CCGG'AA'CACACAGA'TC'TCC	SEQ ID NO.55	5, 7, 15 và 17
GG'AA'CACAC'AGA'TC'TC	SEQ ID NO.56	3, 5, 10, 13 và 15
CGG'AA'CACAC'AGA'TC'TC	SEQ ID NO.57	5, 8, và 10
CGG'AA'CACAC'AGA'TC'TCC	SEQ ID NO.58	4, 6, 11, 14 và 16
CCGG'AA'CACAC'AGA'TC'TC	SEQ ID NO.59	5, 7, 12, 15 và 17
CCGG'AA'CACAC'AGA'TC'TCC	SEQ ID NO.60	5, 7, 11, 14 và 16

Các đầu dò HLA-B*15:02 nêu trên chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) và được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) cho bước sóng phát xạ 520 nm khi bị kích thích ở bước sóng 495nm và có thể quan sát được trên kênh màu chuẩn tương ứng của thiết bị real time-PCR. Các chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) cho bước sóng phát xạ ở 556 nm khi bị kích thích ở bước sóng 535 nm và có thể quan sát được trên một kênh màu khác của thiết bị real time-PCR. Theo một phương án ưu tiên, đầu dò HLA-B*15:02 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM). Theo một phương án ưu tiên khác đầu dò HLA-B*15:02 được gắn chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) để thu được các kênh màu phát xạ tương ứng trên thiết bị real time-PCR.

Cặp mồi beta-actin được thiết kế dựa trên trình tự gen beta-actin cho phép nhân đoạn đặc hiệu kích thước 60 bp nêu trong SEQ ID NO.66. Cặp mồi beta-actin bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.61 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.62 sau:

Cặp mồi beta-actin	Số trình tự
TGAGCGCGGCTACAGCTT	SEQ ID NO.61
TCCTTAATGTCACGCACGATTT	SEQ ID NO.62

Cặp mồi beta-actin cho phép khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu của gen beta-actin chuẩn nội của người có trong plasmit chứa gen beta-actin kích thước 3867 bp trong kit theo sáng chế. Đoạn khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID NO.66 kích thước 60 bp là một đoạn đặc hiệu của gen beta-actin. Nồng độ cặp mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 2 đến 10 pmol/μl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, đối với mỗi cặp mồi, lượng mồi xuôi và mồi ngược luôn bằng nhau, do đó, nồng độ của mỗi đoạn mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Đầu dò này cho phép bắt cặp đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO.66 và giải phóng chất hấp thụ huỳnh quang hấp thụ ánh sáng có bước sóng 580 nm và phát xạ ở bước sóng 604 nm cho phép phát hiện được trên kênh màu chuẩn của thiết bị real time-PCR. Nồng độ của mỗi đoạn mồi beta-actin trong mỗi phản ứng PCR nằm trong khoảng từ 1 đến 5 pmol/μl.

Để tạo thành dung dịch phản ứng PCR, dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza được bổ sung các thành phần nêu trên, cụ thể bao gồm:

- cặp mồi HLA-A*31:01 bao gồm mồi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10; và mồi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20;

- đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-

fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp môi HLA-B*15:02 bao gồm môi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40; và môi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50;

- đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.51-60, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetrachlorofluorescein (TET), 6 – carboxy – 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp môi beta-actin có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62; và

- đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Đối chứng dương được sử dụng bao gồm dung dịch chứa các plasmit tái tổ hợp chứa trình tự đặc hiệu cho gen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02 và beta-actin. Các trình tự này được tốt nhất được tái tổ hợp trong plasmit, ví dụ pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2, và mỗi loại plasmit này có trong đối chứng dương với nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl.

Plasmit PC3101 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64 có kích thước 270 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-A*31:01 của người. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen HLA-A*31:01 trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC3101 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64.

Plasmit PC1502 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65 có kích thước 532 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-B*15:02 của người. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen HLA-B*15:02 trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit PC1502 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65.

Plasmit IC-actin tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66 có kích thước 60 bp, đây là một đoạn đặc trưng của beta-actin của người. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng với đoạn gen beta-actin trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit IC-actin tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66.

Đối chứng dương được phối trộn hỗn hợp ba loại plasmit tái tổ hợp trên với lượng bằng nhau theo, cụ thể là theo tỷ lệ 1:1:1, với mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/ μ l tạo thành mẫu đối chứng dương trong kit theo sáng chế.

Đối chứng âm được sử dụng bao gồm dung dịch chứa các plasmit tái tổ hợp NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502 và NC2_1502, IC-actin chứa trình tự đặc hiệu cho gen HLA-A, HLA-B đặc trưng của tộc người Kinh, Việt Nam, nhưng không phải gen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 và gen beta-actin. Các trình tự này tốt nhất được tái tổ hợp trong plasmit, ví dụ pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 và mỗi loại plasmit này có trong đối chứng dương với nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/ μ l.

Plasmit NC1_3101 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67 có kích thước 158 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-A của người Kinh, Việt Nam, nhưng không thuộc gen HLA-A*31:01, cụ thể là trình tự này đặc hiệu cho các trình tự thuộc alen HLA-A*01:01, HLA-A*03:02, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:07, HLA-A*02:06, HLA-A*11:01, HLA-A*11:02, HLA-A*11:04, HLA-A*26:01, HLA-A*68:01, HLA-A*74:01 và HLA-A*34:01. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng để xác định gen HLA-A đặc trưng nêu trên của người Kinh, Việt Nam có trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit NC1_3101 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67.

Plasmit NC2_3101 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68 có kích thước 150 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-A của người Kinh, Việt Nam, nhưng không thuộc gen HLA-A*31:01, cụ thể là trình tự này đặc hiệu cho các trình tự thuộc alen HLA-A*24:02, HLA-A*24:03, HLA-A*24:07, HLA-A*24:10, HLA-A*29:01, HLA-A*33:01, HLA-A*33:02 và HLA-A*33:03. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng để xác định gen HLA-A của người Kinh có trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit NC2_3101 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68.

Plasmit NC3_3101 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69 có kích thước 128 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-A của người Kinh, Việt Nam, nhưng không thuộc gen HLA-A*31:01, cụ thể là trình tự này đặc hiệu cho các trình tự thuộc alen HLA-A*30:01, HLA-A*30:02 và HLA-A*30:03. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng để xác định gen HLA-A của người Kinh có trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit NC_3101 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69.

Plasmit NC1_1502 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.70 có kích thước 160 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-B của người Kinh, Việt Nam, nhưng không thuộc gen HLA-B*15:02, cụ thể là trình tự này đặc hiệu cho các trình tự thuộc alen HLA-B*07:05, HLA-B*08:01, HLA-B*15:03, HLA-B*27:06, HLA-B*15:18, HLA-B*38:02, HLA-B*39:01, HLA-B*39:05, HLA-B*39:15, HLA-B*56:01, HLA-B*56:02, HLA-B*18:01, HLA-B*18:02, HLA-B*35:01, HLA-B*35:03, HLA-B*35:05, HLA-B*51:01, HLA-B*51:02, HLA-B*52:01 và HLA-B*54:01. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng để xác định gen HLA-B của người Kinh. Việt Nam có trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmit NC1_1502 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO70.

Plasmit NC1_1502 tái tổ hợp là plasmit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71 có kích thước 172 bp, đây là một đoạn đặc trưng của gen HLA-B của người Kinh, Việt Nam, nhưng không thuộc gen HLA-B*15:02, cụ thể là trình tự này đặc hiệu cho các trình tự thuộc alen HLA-B*13:01, HLA-B*13:02, HLA-B*44:03, HLA-B*15:17,

HLA-B*40:01, HLA-B*40:02, HLA-B*40:06, HLA-B*15:01, HLA-B*15:07, HLA-B*15:25, HLA-B*15:27, HLA-B*48:01, HLA-B*46:01, HLA-B*57:01 và HLA-B*58:01. Đoạn gen này đóng vai trò đối chứng để xác định gen HLA-B của người Kinh có trong mẫu sinh học cần phát hiện. Plasmid NC1_1502 tái tổ hợp này có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71.

Đối chứng âm được phối trộn hỗn hợp năm loại plasmid tái tổ hợp trên và plasmid IC-actin tái tổ hợp với lượng bằng nhau theo, cụ thể là theo tỷ lệ 1:1:1:1:1, với mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmid/ μ l tạo thành mẫu đối chứng âm trong kit theo sáng chế.

Dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương có thành phần nêu trên sau khi được phối trộn, được đựng trong các lọ chứa độc lập và được đóng gói kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kit theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước a) tạo các plasmid tái tổ hợp; b) tổng hợp và chuẩn độ mỗi đoạn mồi; c) tổng hợp và chuẩn độ các đoạn dò; và d) thu kit.

Trong bước tạo các plasmid tái tổ hợp, bước này có thể thực hiện bằng cách chèn lần lượt trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71 vào các plasmid khả dụng, ví dụ về các plasmid có thể sử dụng làm plasmid tái tổ hợp có thể được chọn từ nhóm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2. Các plasmid này là plasmid thương mại và kỹ thuật tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp plasmid. Cụ thể, các trình tự nêu trong SEQ ID NO.61-71 mã hóa lần lượt các đoạn gen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02, beta-actin và các đoạn gen HLA-A, HLA-B đặc trưng của tộc người Kinh, Việt Nam được tổng hợp hóa học, sau đó tái tổ hợp vào plasmid, ví dụ các plasmid pUC19, pJET1 hoặc pTOP TA V2. Theo các phương án khác, các plasmid thương mại khác có thể được biến nạp và các trình tự nêu trong SEQ ID NO.61-71 cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, plasmid được sử dụng làm plasmid tái tổ hợp tốt hơn là plasmid pUC19, tốt hơn nữa là pJET1 hoặc pTOP TA V2. Các plasmid tái tổ hợp này được biến

nạp vào tế bào *E.coli*, sau khi chọn lọc, và nuôi cấy và chiết tách các plasmit thu được các plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71. Các plasmit tái tổ hợp này được ký hiệu lần lượt là PC3101, PC1502, IC-actin, NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502, NC2_1502, mà mỗi plasmit tái tổ hợp này mang một đoạn nucleotit tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.64-71, tương ứng. Các plasmit tái tổ hợp này được chuẩn độ đến nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/ μ l dùng để phối trộn mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương trong kit theo sáng chế.

Trong bước tổng hợp và chuẩn độ mỗi đoạn mồi, các đoạn mồi xuôi và mồi ngược tương ứng cho HLA-A*31:01, HLA-B*15:02, beta-actin được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp hóa học. Các kỹ thuật tổng hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện để thu các đoạn mồi. Các đoạn mồi được chuẩn độ đến nồng độ 100 pmol/ μ l để làm vật liệu phối trộn tạo ra dung dịch PCR trong kit theo sáng chế.

Cặp mồi HLA-A*31:01 bao gồm mồi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.1-10 và mồi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.11-20. Theo các phương án ưu tiên, mồi xuôi HLA-A*31:01 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và mồi ngược HLA-A*31:01 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.11.

Cặp mồi HLA-B*15:02 bao gồm mồi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.31-40 và mồi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.41-50. Theo các phương án ưu tiên, mồi xuôi HLA-B*15:02 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.31 và mồi ngược HLA-B*15:02 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.41.

Cặp mồi beta-actin bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62 cho phép nhân đoạn gen beta-actin của người.

Các đoạn mồi sau khi được tổng hợp, được chuẩn độ bằng nước cất đến nồng độ 100 pmol/ μ l để làm vật liệu phối trộn tạo ra dung dịch PCR trong kit theo sáng chế.

Trong bước tổng hợp và chuẩn độ các đoạn dò bằng cách tổng hợp nhân tạo, các đoạn dò được tổng hợp với các vị trí axit nucleic dạng cầu khóa. Các kỹ thuật tổng hợp với các axit nucleic dạng cầu khóa là đã biết và có thể thực hiện theo kỹ thuật của Birte Vester và Jesper (Birte Vester and Jesper Wengel, Biochemistry Volume 43, Number 42 October 26, 2004). Các đoạn dò này sau khi tổng hợp được gắn đầu huỳnh quang và đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang vào đầu 3'. Các kỹ thuật gắn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp hóa chất. Các

đoạn dò sau khi tổng hợp và gắn đầu huỳnh quang được chuẩn độ mỗi đoạn dò đến nồng độ 10 pmol/μl dùng để làm vật liệu phối trộn tạo ra dung dịch PCR trong kit theo sáng chế.

Đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.21-30 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò HLA-A*31:01 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.25, trong đó có LNA ở các vị trí 6, 9, 11 và 13 và được gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5', chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ ở đầu 3'.

Đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.51-60 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-diclolo-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó đầu dò HLA-B*15:02 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.54, trong đó có LNA ở các vị trí 5, 7, 15 và 17 và được gắn huỳnh quang HEX ở đầu 5', chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ ở đầu 3'.

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63 được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, đầu dò beta-actin được gắn huỳnh quang Texas Red cho kênh màu đỏ trong kênh màu chuẩn của thiết bị real time-PCR.

Trong bước thu kit, tiến hành phối trộn các thành phần thu được với nước khử proteaza hoặc dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza để thu dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm.

Dung dịch phản ứng PCR được phối trộn các thành phần bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chứa cặp mồi HLA-A*31:01 với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; đầu dò HLA-A*31:01 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; cặp mồi HLA-B*15:02 với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl; đầu dò HLA-B*15:02 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl; cặp mồi beta-actin với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl; và đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl.

Đối chứng dương bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp PC3101, PC1502 và IC-actin thu được ở trên có tỷ lệ bằng nhau đến khi mỗi loại đạt nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl để thu được đối chứng dương.

Đối chứng âm bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502 và NC2_1502 thu được ở trên có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó để thu được đối chứng âm.

Sau khi phối trộn đều nhẹ nhàng từng dung dịch nêu trên, thu được các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm. Mỗi dung dịch này được chứa trong các lọ chứa độc lập thu được kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước đóng gói các lọ chứa dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương và kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các cặp mồi để xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02, beta-actin có trong mẫu sinh học như được mô tả ở trên, trong đó:

Cặp mồi cho alen HLA-A*31:01 gồm mồi xuôi được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10, mồi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20;

Cặp mồi cho alen HLA-B*15:02 gồm mồi xuôi được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40, mồi ngược được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50;

Cặp mỗi beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62.

Sáng chế còn đề cập đến các đầu dò để xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02 và beta-actin có trong mẫu sinh học như được mô tả ở trên, trong đó:

Đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

Đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.51-60, đầu dò này được gắn huỳnh quang 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), hoặc Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

Đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Sáng chế cũng đề cập đến các plasmit tái tổ hợp chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.64-71 để làm đối chứng âm và đối chứng dương trong xác định alen HLA-A*31:01, HLA-B*15:02 và beta-actin có trong mẫu sinh học. Các plasmit tái tổ hợp này được chọn từ nhóm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.67-71.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh

Sản xuất mẫu dung dịch PCR

Để sản xuất kit bao gồm 50 mẫu phản ứng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh, các đoạn môi xuôi, môi ngược, đầu dò huỳnh quang được đặt tổng hợp hóa học bởi hãng IDT, các thành phần khác bao gồm các dung dịch dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP, UNG (uracil-N-

glycosylase), Taq ADN polymeraza là các thành phần thương mại của hãng Enzymomics, Hàn Quốc.

Thành phần	Trình tự	Hàm lượng pmol/μl
Mồi xuôi HLA-A*31:01	ACTCCATGAGGTATTTCAC	100
Mồi ngược HLA-A*31:01	ACTCGGTCAATCTGTGAG	100
Đầu dò HLA-A*31:01	HEX-ACTC'AGG'CC'TCTCC-3IABkFQ	10
Mồi xuôi HLA-B*15:02	CGCGAGTCCGAGGTTGG	100
Mồi ngược HLA-B*15:02	AGGTTCCGCAGGCTC	100
Đầu dò HLA-B*15:02	FAM- GG'A'CACACAGA'TC'TC -3IABkFQ	10
Mồi xuôi beta-actin	TGAGCGCGGCTACAGCTT	100
Mồi ngược beta-actin	TCCTTAATGTCACGCACGATTT	100
Đầu dò beta-actin	Texas Red-CCACCACGGCCGAGCGG-3IABkFQ	10

Lấy 625 μl dung dịch đệm 2X chứa các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chuẩn theo dung dịch thương mại của hãng Enzymomics, Hàn Quốc và bổ sung lần lượt 5 μl mồi xuôi HLA-A*31:01, 5 μl mồi ngược HLA-A*31:01, 1 μl đầu dò HLA-A*31:01, 5 μl mồi xuôi HLA-B*15:02, 5 μl mồi ngược HLA-B*15:02, 1 μl đầu dò HLA-B*15:02, 2,5 μl mồi xuôi beta-actin, 2,5 μl mồi ngược beta-actin, 1 μl đầu dò beta-actin, cuối cùng bổ sung 347 μl nước khử nucleaza để thu được 1000 μl dung dịch phản ứng PCR theo sáng chế. Dung dịch này được chia đều vào 50 ống nhựa PCR dung tích 200 μl, mỗi ống 20 μl thu được 50 ống phản ứng chứa dung dịch phản ứng PCR.

Sản xuất mẫu đối chứng âm

Plasmit pUC19 tái tổ hợp chứa trình tự đặc hiệu cho gen HLA-A*31:01 có kích thước 2956 bp chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 64, plasmit pJET1 được tái tổ hợp trình đặc hiệu cho gen HLA-B*15:02 có kích thước 3512 bp chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.65, và plasmit pTOP TA V2 tái tổ hợp chứa trình tự đặc hiệu cho gen beta-actin có kích thước 3867 bp chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.66 được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Sau khi biến nạp vào tế bào *E.coli*, chọn lọc, nuôi cấy và chiết tách thu plasmit tái tổ hợp được ký hiệu là PC3101, PC1502 và IC-actin, tương ứng. Quá trình biến nạp, nhân dòng thu plasmit tái tổ hợp được đặt hàng và được công ty hóa sinh thứ ba thực hiện. Các plasmit tái tổ hợp này được chuẩn với hàm lượng 100 ng/μl.

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

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

Trong đó C (ng/μl) là nồng độ của plasmit, L (bp) là kích thước của vector pJET1, pUC19 và pTOP TA V2 tái tổ hợp mang đoạn gen HLA-B*15:02 (3512 bp), HLA-A*31:01 (2956 bp) và beta-actin (3867 bp).

Theo công thức trên ống plasmit mang đoạn gen HLA-B*15:02 có số bản sao là $2,64 \times 10^{10}$ plasmit/μl, plasmit mang đoạn gen HLA-A*31:01 có số bản sao là $3,13 \times 10^{10}$ plasmit/μl và beta-actin có số bản sao là $2,40 \times 10^{10}$ plasmit/μl.

Tiến hành pha loãng các plasmit tái tổ hợp với nước cất khử trùng đến nồng độ 3×10^4 bản sao/μl, trộn 3 plasmit đó với nhau tỷ lệ 1:1:1 theo thể tích. Chia 20 μl dung dịch vào 3 ống nhựa PCR dung tích 200 μl thu được 3 mẫu đối chứng âm có nồng độ 10^4 plasmit/μl.

Sản xuất mẫu đối chứng dương

Các plasmit pJET1 được tái tổ hợp trình tự nêu trong SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68, SEQ ID NO.69 độc lập, của gen HLA-A, nhưng không phải HLA-A*31:01 phổ biến với tộc người Kinh, Việt Nam có kích thước 158 bp và 150 bp và 128 bp và các plasmit pJET1 tái tổ hợp trình tự nêu trong SEQ ID NO.71 và SEQ ID NO.71, độc lập của gen đặc hiệu HLA-B*15:02 phổ biến với tộc người Kinh, Việt Nam có kích thước 162 bp và 172 bp, tương ứng, được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Sau khi biến nạp vào tế bào *E.coli*, chọn lọc, nuôi cấy và chiết tách thu plasmit tái tổ hợp được ký hiệu là NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502 và NC2_1502, tương ứng. Quá trình biến nạp, nhân dòng thu plasmit tái tổ hợp được đặt hàng và được công ty hóa sinh thứ ba thực hiện. Plasmit IC-actin thu được như ở mục sản xuất mẫu đối chứng âm. Các plasmit tái tổ hợp này được chuẩn với hàm lượng 100 ng/μl.

Tiến hành pha loãng các plasmit tái tổ hợp với nước cất khử trùng đến nồng độ 6×10^4 bản sao/μl theo công thức nêu trên, trộn 6 loại plasmit với nhau theo tỷ lệ bằng nhau theo thể tích. Chia 20 μl dung dịch vào 3 ống nhựa PCR dung tích 200 μl thu được 3 mẫu đối chứng dương có nồng độ 10^4 plasmit/μl.

Tạo kit

Xếp 50 mẫu dung dịch phản ứng PCR bao gồm 20µl dung dịch phản ứng PCR thu được ở trên được đựng trong ống phản ứng PCR có dung tích 200 µl vào 5 dãy trên giá nhựa PCR 96 giếng. Các ống được đánh dấu MasterMix.

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

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

Đóng gói giá PCR 96 giếng đựng các ống mẫu dung dịch phản ứng PCR, mẫu đối chứng âm, mẫu đối chứng âm vào túi bạc và đóng kèm hướng dẫn sử dụng với túi zip bao ngoài, thu được kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh. Kit được bảo quản ở tủ -20°C. Thời gian sử dụng kit trong vòng 12 tháng.

*Ví dụ 2. Thử nghiệm phát hiện alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 của kit theo sáng chế*

Để đánh giá hiệu quả phát hiện alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 gây dị ứng thuốc Carbamazepin điều trị bệnh động kinh có trong mẫu sinh học, các thử nghiệm được tiến hành với 77 mẫu ADN được chiết từ mẫu máu tổng số của bệnh nhân khác nhau, trong đó có 33 mẫu đã được xác định không có alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 và 44 mẫu ADN đã được xác định dương tính với HLA-A*31:01 và/hoặc HLA-B*15:02 theo kỹ thuật PCR-SSO luminex được cung cấp bởi Trung tâm máu Quốc gia, Viện Huyết học truyền máu Trung Ương. Các mẫu được đánh số mã ngẫu nhiên, kết quả đánh giá được thực hiện bằng cách so sánh kết quả nhằm xác định sự sai khác.

Mẫu thử nghiệm được tiến hành với kỹ thuật real time-PCR với kit được sản xuất theo Ví dụ 1. Phản ứng PCR được thực hiện trên hệ thống máy real time-PCR LightCycler 96, Roche Diagnostics.

Đối chứng được đánh giá bằng kỹ thuật PCR-SSO trên hệ thống Luminex, là chuẩn xét nghiệm đang được áp dụng để xác định HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

Các mẫu được PCR với chu trình nhiệt bao gồm một chu kỳ với 50°C trong 4 phút, 95°C trong 10 phút để biến tính ban đầu, 40 chu kì với biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mồi kéo dài chuỗi ở 63°C trong 45 giây.

Sau khi hoàn tất các chu kỳ nhiệt, các mẫu thu được các đường biểu diễn khuếch đại tương ứng. Kết quả real time-PCR xác định khả năng sàng lọc alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 của kit theo sáng chế được mô tả tại Bảng 1 và 2, và so sánh với kết quả phân tích alen HLA-A và HLA-B bằng kỹ thuật PCR-SSO trên hệ thống Luminex được coi là chuẩn vàng áp dụng tại các bệnh viện.

Bảng 1: Kết quả real time-PCR phát hiện alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 trong mẫu thử nghiệm

STT	Mã số mẫu	PCR-SSO		Kết quả real time PCR của kit theo sáng chế		
		HLA-A A1/A2	HLA-B B1/B2	HLA-A*31:01	HLA-B*15:02	ACTB
1	140077	31:01-33:01	15:02-58:01	+	+	+
2	160300	31:01-33:03	15:02-58:01	+	+	+
3	140022	02:01-31:01	15:02-46:02	+	+	+
4	140161	11:01-31:01	15:02-54:01	+	+	+
5	140406	24:03-31:01	15:02-54:01	+	+	+
6	140570	11:01-31:01	15:02-46:01	+	+	+
7	150014	11:01-31:01	15:02-46:01	+	+	+
8	150266	24:02-31:01	15:02-51:02	+	+	+
9	150283	24:02-31:01	15:02-40:02	+	+	+
10	150341	11:01-31:01	15:02-35:05	+	+	+
11	150396	02:01-31:01	15:02-46:01	+	+	+
12	150599	11:01-31:01	15:02-46:01	+	+	+
13	150676	02:03-31:01	15:02-38:02	+	+	+
14	150706	11:01-31:01	15:02-15:02	+	+	+
15	150811	02:03-31:01	15:02-51:02	+	+	+
16	160113	24:02-31:01	15:02-54:01	+	+	+
17	160160	11:02-31:01	15:02-51:02	+	+	+
18	160365	11:01-31:01	15:02-35:01	+	+	+
19	160373	11:01-31:01	15:02-46:01	+	+	+
20	160800	11:02-31:01	15:02-51:02	+	+	+
21	140181	31:01-33:01	44:03-51:02	+	-	+
22	140295	31:01-33:01	51:02-58:01	+	-	+
23	160493	31:01-68:01	46:01-51:02	+	-	+

STT	Mã số mẫu	PCR-SSO		Kết quả real time PCR của kit theo sáng chế		
		HLA-A A1/A2	HLA-B B1/B2	HLA-A*31:01	HLA-B*15:02	ACTB
24	160639	31:01-33:03	44:03-44:03	+	-	+
25	170029	31:01-33:03	51:02-58:01	+	-	+
26	140182	31:01-33:01	44:03-51:02	+	-	+
27	140107	02:01-33:02	15:02-58:01	-	+	+
28	150285	01:01-24:02	15:02-15:17	-	+	+
29	150530	24:01-33:01	15:02-58:01	-	+	+
30	140544	01:01-24:02	15:02-35:05	-	+	+
31	140518	11:01-24:02	15:02-38:02	-	+	+
32	140001	11:01-29:01	15:02-51:02	-	+	+
33	140024	02:06-11:01	15:02-15:02	-	+	+
34	140553	11:01-02:01	15:02-46:01	-	+	+
35	140666	02:01-02:06	15:02-15:25	-	+	+
36	140189	01:01-11:01	15:02-27:06	-	+	+
37	161006	11:01-33:03	15:02-15:13	-	+	+
38	140222	02:03-24:02	15:02-18:01	-	+	+
39	150353	02:01-24:10	15:02-15:11	-	+	+
40	160152	02:03-03:01	15:02-18:02	-	+	+
41	140098	11:01-11:01	15:02-15:02	-	+	+
42	140238	11:01-34:01	15:01-15:02	-	+	+
43	140150	11:01-68:01	08:01-15:02	-	+	+
44	150487	24:02-29:01	13:01-15:02	-	+	+
45	140120	33:01-33:01	58:01-58:01	-	-	+
46	140135	02:01-33:01	46:01-58:01	-	-	+
47	140078	01:01-33:01	57:01-58:01	-	-	+
48	140091	11:01-33:01	15:01-58:01	-	-	+
49	140046	33:01-33:01	44:03-58:02	-	-	+
50	140514	11:01-33:01	46:01-58:01	-	-	+
51	140109	01:01-11:02	40:01-57:01	-	-	+
52	140177	01:01-24:02	27:06-57:01	-	-	+
53	160184	24:02-29:01	07:05-13:01	-	-	+
54	140124	01:01-02:01	37:01-39:01	-	-	+
55	140467	02:02-11:01	41:01-55:02	-	-	+

STT	Mã số mẫu	PCR-SSO		Kết quả real time PCR của kit theo sáng chế		
		HLA-A A1/A2	HLA-B B1/B2	HLA-A*31:01	HLA-B*15:02	ACTB
56	140491	02:05-11:01	50:01-56:04	-	-	+
57	160167	03:01-29:01	07:05-35:03	-	-	+
58	160193	03:02-33:03	13:02-44:03	-	-	+
59	140130	33:03-34:01	15:12-58:01	-	-	+
60	140270	11:01-26:01	07:02-40:01	-	-	+
61	140515	30:01-33:01	07:01-58:01	-	-	+
62	140703	24:02-30:01	13:02-15:01	-	-	+
63	140029	11:02-24:02	07:05-15:12	-	-	+
64	140200	29:01-33:03	07:05-44:03	-	-	+
65	140544	01:01-24:02	15:08-35:05	-	+	+
66	140090	02:01-02:01	46:01-46:01	-	-	+
67	140118	24:02-33:01	18:01-40:02	-	-	+
68	140559	24:03-26:01	18:02-38:02	-	-	+
69	150085	02:01-24:02	18:02-46:01	-	-	+
70	160049	24:10-33:03	18:02-58:01	-	-	+
71	150987	02:01-33:03	15:13-40:06	-	-	+
72	150704	11:01-24:02	15:01-18:01	-	-	+
73	150299	01:01-68:01	07:02-37:01	-	-	+
74	140391	11:01-11:01	15:13-38:02	-	-	+
75	150375	02:01-02:03	15:13-15:25	-	-	+
76	140153	02:06-33:01	44:03-46:01	-	-	+
77	140254	11:01-33:01	15:01-58:01	-	-	+

Bảng 2: Độ nhạy và độ đặc hiệu của kit theo sáng chế và so sánh độ tương đồng với kit thương mại sử dụng kỹ thuật PCR-SSO trên hệ thống Luminex

PCR-SSO	Real-time PCR		Tổng cộng
	+	-	
+	44	0	44
-	1	32	33
Tổng cộng	45	32	77
Độ tương đồng: 98,7 %; độ nhạy: 100 %; độ đặc hiệu: 97 %			

Kết quả trong Bảng 1 và 2 cho thấy thử nghiệm trên 77 mẫu tham chiếu gồm 44 mẫu dương tính (HLA-A*31:01 hoặc/và HLA-B*15:02) và 33 mẫu âm tính với HLA-B*15:02 và HLA-A*31:01 được xác định bằng kit thương mại sử dụng kỹ thuật PCR-SSO, kit theo sáng chế phát hiện 45/44 mẫu dương tính, 33/33 mẫu âm tính cho độ nhạy thử nghiệm đạt 100 %, độ đặc hiệu đạt 97 % và độ tương đồng của kit theo sáng chế và kit thương mại đạt 98,7 %.

Kết quả mô tả tại Hình 1 cho thấy chỉ thu được tín hiệu kênh Texas Red phát hiện gen nội chuẩn beta-actin và không thu được tín hiệu của kênh HEX/FAM đặc hiệu cho HLA-A*31:01/HLA-B*15:02 cho mẫu ADN âm tính; trong khi đó, kết quả Hình 2, cả tín hiệu FAM đặc hiệu cho alen HLA-B*15:02 và tín hiệu Texas Red đặc hiệu cho gen nội chuẩn beta-actin đều xuất hiện tương ứng ở mẫu dương tính với alen HLA-B*15:02; Hình 3, cả tín hiệu HEX đặc hiệu cho alen HLA-A*31:01 và tín hiệu Texas Red đặc hiệu cho gen nội chuẩn beta-actin đều xuất hiện tương ứng ở các mẫu dương tính với alen HLA-A*31:01; Hình 4, cả 3 tín hiệu HEX đặc hiệu cho alen HLA-A*31:01, FAM đặc hiệu cho alen HLA-B*15:02 và tín hiệu Texas Red đặc hiệu cho gen nội chuẩn beta-actin đều xuất hiện tương ứng ở các mẫu dương tính với alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02; đồng thời mẫu đối chứng âm chỉ thu được tín hiệu Texas Red và không thu được tín hiệu FAM/HEX; mẫu đối chứng dương lên cả 3 tín hiệu FAM, HEX, Texas Red. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của kit theo sáng chế, cho phép dễ dàng đánh giá được sự có mặt của các alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 trong mẫu sinh học gây cho phép phát hiện đặc hiệu đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bằng một phản ứng duy nhất.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kit theo sáng chế cho phép phát hiện alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bằng phương pháp real time-PCR sử dụng các đoạn mồi, đoạn dò đặc hiệu cho phép phát hiện đồng thời sự có mặt của cả hai kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh (alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 trong mẫu) chỉ bằng một phản ứng real time-PCR duy nhất. Bằng cách kết hợp các đoạn mồi đặc hiệu cho alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 các đoạn dò có các axit nucleic dạng cầu khóa (LNA) cho phép nhân và phát hiện đặc hiệu đoạn gen đích. Ngoài ra, cùng với các đoạn axit nucleic đặc hiệu cho gen HLA-A và HLA-B người Kinh, Việt Nam, kit cho phép ứng dụng phát

hiện đặc hiệu đối với người Việt, hạn chế được những nhược điểm của các kit thương mại nhập khẩu hiện nay, tránh được hiện tượng dương tính, âm tính giả.

Kit theo sáng chế cho phép chuẩn hóa điều kiện chạy realltime-PCR để phát hiện sự có mặt của alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 một cách nhanh chóng (trong vòng 2 tiếng), đơn giản (duy nhất 1 chu trình nhiệt real time-PCR) và không đòi hỏi kỹ thuật viên có trình độ trong phân tích kết quả (chỉ cần đọc tín hiệu FAM, HEX và Texas Red dương tính) với độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội. Kit cho phép giảm giá thành xét nghiệm, cho phép bác sỹ nhanh chóng chỉ định các thuốc CBZ cho các bệnh nhân điều trị động kinh, tránh được nguy cơ dị ứng thuốc nặng nguy hiểm đến tính mạng bởi nguyên nhân liên quan tới di truyền.

Kit theo sáng chế được thiết kế để phát hiện đồng thời alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 loại bỏ hiện tượng dương tính giả bởi hiện tượng dị hợp của hai alen có trình tự gần giống với HLA-B*15:02 (ví dụ: HLA-B*15:25 và HLA-B*18:01) và HLA-A*31:01 (ví dụ: HLA-A*30:01 và HLA-A*30:02) như các kit và phương pháp hiện có.

Quy trình sản xuất kit theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện, các đoạn môi, đoạn dò được tính toán tối ưu, loại bỏ được hiện tượng phản ứng chéo giữa các đoạn môi, đoạn và đoạn gen đặc hiệu. Sản phẩm kit thu được ổn định, đảm bảo được hiệu quả phát hiện, cho phép thay thế các công cụ và phương pháp phân tích alen HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh hiệu quả.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 bao gồm các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, trong đó:

+ dung dịch phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chứa:

- cặp mồi HLA-A*31:01 bao gồm mồi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.1-10; và mồi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.11-20;

- đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.21-30, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp mồi HLA-B*15:02 bao gồm mồi xuôi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.31-40; và mồi ngược có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.41-50;

- đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO.51-60, đầu dò này được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

- cặp môi beta-actin có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62; và
 - đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63, đầu dò này được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';
- + đối chứng dương bao gồm dung dịch chứa các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:
- plasmit PC3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64;
 - plasmit PC1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65;
 - plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66; và
- + đối chứng âm bao gồm dung dịch chứa các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:
- plasmit NC1_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67;
 - plasmit NC2_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68;
 - plasmit NC3_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69;
 - plasmit NC1_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.70;
 - plasmit NC2_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71; và
 - plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66.
2. Kit theo điểm 1, trong đó thành phần dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương được đựng trong các lọ chứa độc lập và được đóng gói kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.
3. Quy trình sản xuất kit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
- a) tạo các plasmit tái tổ hợp bằng cách chèn lần lượt trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71 vào plasmit, sau khi biến nạp vào tế bào *E.coli*, nuôi cấy và chiết tách plasmit tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64-71 ký hiệu PC3101, PC1502, IC-actin, NC1_3101, NC2_3101, NC3_3101, NC1_1502, NC2_1502, tương ứng;
 - b) tổng hợp và chuẩn độ mỗi đoạn môi bằng cách tổng hợp nhân tạo và chuẩn độ mỗi đoạn môi đến nồng độ 100 pmol/μl, trong đó:

- cặp mỗi HLA-A*31:01 bao gồm mỗi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.1-10; và mỗi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.11-20;
- cặp mỗi HLA-B*15:02 bao gồm mỗi xuôi có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.31-40; và mỗi ngược có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.41-50;
- cặp mỗi beta-actin bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO. 61 và SEQ ID NO.62;

c) tổng hợp và chuẩn độ các đoạn dò bằng cách tổng hợp nhân tạo, gắn đầu huỳnh quang và chuẩn độ mỗi đoạn dò đến nồng độ 10 pmol/ μ l, trong đó:

- đầu dò HLA-A*31:01 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.21-30 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';
- đầu dò HLA-B*15:02 chứa các axit nucleic dạng cầu khóa (locked nucleic acid: LNA) có trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.51-60 được gắn huỳnh quang fluorescein amidit (FAM) hoặc chất phát huỳnh quang được chọn từ nhóm 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX), 5'-tetraclorofluorescein (TET), 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (JOE), 2'-cloro-7'phenyl-1,4-dicloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) và Yakima yellow phosphoramidit (yellow555) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';
- đầu dò beta-actin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.63 được gắn huỳnh quang sulforhodamine 101 axit clorit (Texas Red) hoặc 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3';

d) thu kit bằng cách phối trộn các thành phần thu được với nước khử proteaza hoặc dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza để thu dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, trong đó:

+ dung dịch phản ứng PCR bao gồm dung dịch đệm 2X có các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza chứa:

- cặp mỗi HLA-A*31:01 với mỗi đoạn mỗi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/ μ l;

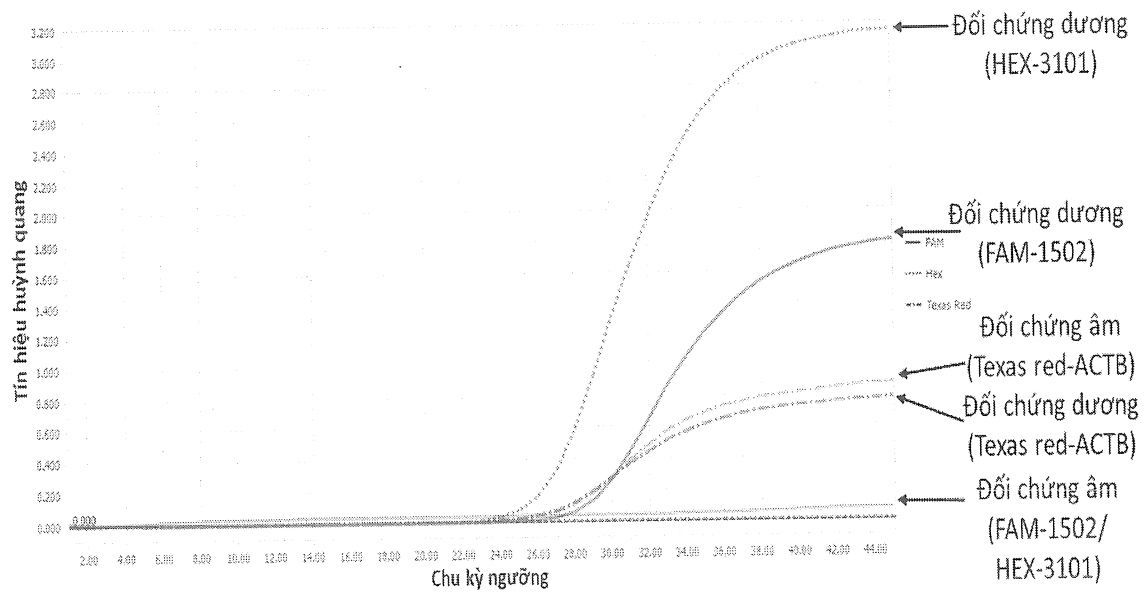
- đầu dò HLA-A*31:01 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
 - cặp mồi HLA-B*15:02 với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 20 pmol/μl;
 - đầu dò HLA-B*15:02 có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
 - cặp mồi beta-actin với mỗi đoạn mồi có nồng độ từ 2 đến 10 pmol/μl; và
 - đầu dò beta-actin có nồng độ từ 0,2 đến 5 pmol/μl;
- + đối chứng dương bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau đến khi mỗi loại đạt nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:
- plasmit PC3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.64;
 - plasmit PC1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.65;
 - plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66; và
- + đối chứng âm bao gồm nước khử proteaza được bổ sung lần lượt các plasmit tái tổ hợp có tỷ lệ bằng nhau và mỗi loại có nồng độ từ 10^3 đến 10^5 plasmit/μl, trong đó:
- plasmit NC1_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.67;
 - plasmit NC2_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.68;
 - plasmit NC3_3101 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.69;
 - plasmit NC1_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.70;
 - plasmit NC2_1502 tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.71; và
 - plasmit IC-actin tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.66

sau khi trộn đều, thu được các dung dịch phản ứng PCR, đối chứng dương và đối chứng âm, mỗi dung dịch này được chứa trong các lọ chứa độc lập thu được kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh.

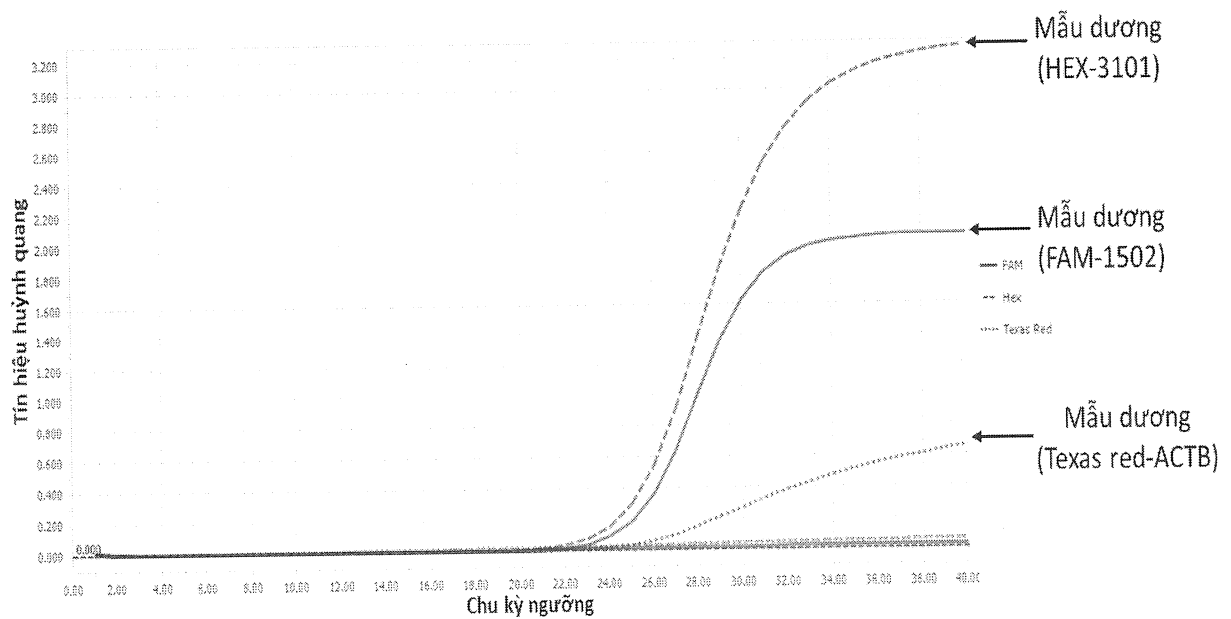
4. Quy trình theo điểm 3, trong đó plasmit được sử dụng để tạo các plasmit tái tổ hợp PC3101, PC1502, IC-actin, NC1_3101, NC2_3101, NC1_1502 và NC2_150 được chọn từ nhóm bao gồm plasmit pUC19, pJET1 và pTOP TA V2.

5. Quy trình theo điểm 3 hoặc 4, trong đó quy trình này còn bao gồm bước đóng gói các lọ chứa dung dịch phản ứng PCR, đối chứng âm, đối chứng dương và kèm theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02.

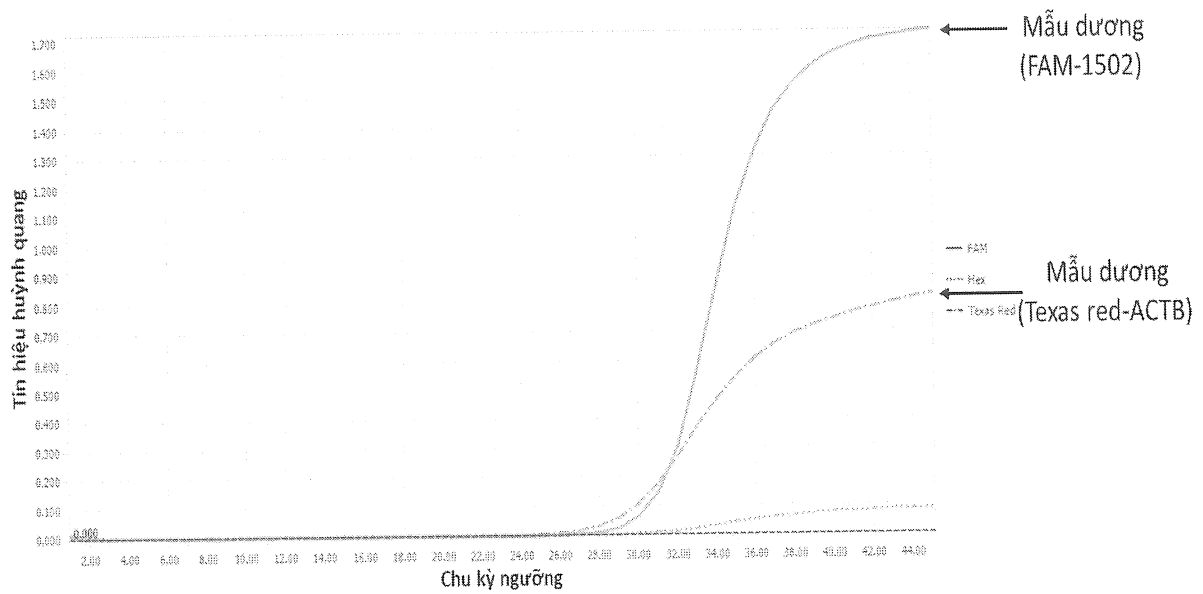
HÌNH 1



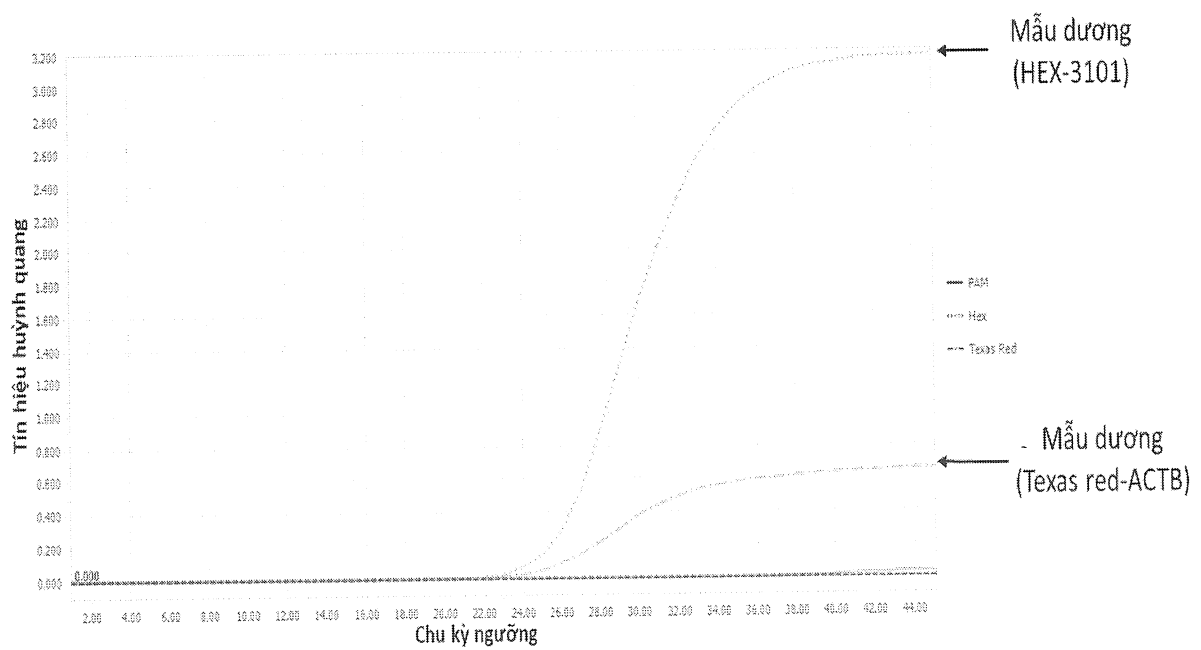
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> Kit để phát hiện đồng thời gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh HLA-A*31:01 và HLA-B*15:02 và quy trình sản xuất kit này

<130>

<160> 71

<170>

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 1

CTCCATGAGG TATTTTCAC

18

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

ACTCCATGAG GTATTTTCAC

19

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 3

CCACTCCATG AGGTATTTCA C

21

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220> <400> 4 C C A C T C C A T G A G G T A T A T C A C	21
<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 5 C C A C T C C A T G A G G T A T C T C A C	21
<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 6 C C A C T C C A T G A G G T A T G T C A C	21
<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 7 C A C T C C A T G A G G T A T T T C A C C	21
<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 8 C T C C A T G A G G T A T T T C A C C	19

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 9
 ACTCCATGAG GTATTTCCACC

20

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 10
 CCACTCCATG AGGTATTTCA CC

22

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 11
 ACTCGGTCAA TCTGTGAG

18

<210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 12
 CACTCGGTCA ATCTGTGAG

19

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220> <400> 13 CCACTCGGTC AATCTGTGAG	20
<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 14 CCACTCGGTC AATCTGTGAG T	21
<210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 15 CCACTCGGTC AATCTGTGAG TG	22
<210> 16 <211> 16 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 16 CAGGTCCACT CGGTCA	16
<210> 17 <211> 17 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo <220> <223> Đoạn mỗi	
<220> <400> 17 CCAGGTCCAC TCGGTCA	17

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

<220>
 <400> 18
 CCAGGTCCAC TCGGTCAA

18

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 19
 CCCAGGTCCA CTCGGTCA

18

<210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 20
 CCCAGGTCCA CTCGGTCAA

19

<210> 21
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (5), (8), (10) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 21
 ACTC'AGG'CC'T CTCC

14

<210> 22
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<222> (6), (9), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò

<220>

<400> 22

TACTC'AGG'CC 'TCTCC

15

<210> 23

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (6), (9), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 23

TACTC'AGG'CC 'TCTCCT

16

<210> 24

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (5), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 24

TACTC'AGGCC 'TCTCCT

16

<210> 25

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (6), (9), (11), (13) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 25

TACTC'AGG'CC 'TC'TCCT

16

<210> 26

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (4), (6), (9), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 26

TAC'TC'AGG'CC 'TCTCCT

16

<210> 27

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (6), (9), (10), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 27

TACTC'AGG'C'C 'TCTCCT

16

<210> 28

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (6), (8), (9), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 28

TACTC'AG'G'CC 'TCTCCT

16

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (6), (9), (10), (12) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 29

TACTC'AGG'CC 'T'CTCCT

16

<210> 30

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (9), (11) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 30
TACTCAGG'CC 'TCTCCT

16

<210> 31
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 31
CGCGAGTCCG AGGTTGG

17

<210> 32
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 32
CGCGAGTCCG AGGGTGG

17

<210> 33
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 33
CGCGAGTCCG AGGCTGG

17

<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 34
CGCGAGTCCG AGGATGGC

18

<210> 35
<211> 18

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

<220>
<400> 35
CGCGAGTCCG AGGTTGGC

18

<210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 36
CGCGAGTCCG AGGGTGGC

18

<210> 37
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 37
CGCGAGTCCG AGGCTGGC

18

<210> 38
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 38
CGCGAGTCCG AGGATTGC

18

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 39
 CGCGAGTCCG AGGATAGC 18

<210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 40
 CGCGAGTCCG AGGATCGC 18

<210> 41
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 41
 AGGTTCCGCA GGCTC 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 42
 AGGTTCCGCA GGCTCT 16

<210> 43
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 43
 AGGTTCCGCA GGCTCTC 17

<210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 44
 AGGTTCCGCA GGCTCTCT

18

<210> 45
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 45
 CAGGTTCCGC AGGCTCTCT

19

<210> 46
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 46
 CAGGTTCCGC AGGCTCTCT

19

<210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 47
 AGGTTCCGCA GGCTCTCTC

19

<210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 48
 GGTTCGCGAG GCTCTCT 17

<210> 49
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 49
 GTTCCGCGAGG CTCTCT 16

<210> 50
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 50
 TTCCGCGAGG TCTCT 15

<210> 51
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (3), (5), (13), (15) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 51
 GG'AA'CACACA GA'TC'TC 16

<210> 52
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (4), (6), (14), (16) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò,

<220>
 <400> 52

CGG'AA'CACAC AGA'TC'TC

17

<210> 53

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (5), (8), (10) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 53

CGG'AA'CACAC AGA'TC'TCC

18

<210> 54

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (5), (7), (15), (17) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 54

CCGG'AA'CACA CAGA'TC'TC

18

<210> 55

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (5), (7), (15), (17) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 55

CCGG'AA'CACA CAGA'TC'TCC

19

<210> 56

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<222> (3), (5), (10), (13), (15) là axit nucleic dạng cầu khóa

<223> Đoạn dò,

<220>

<400> 56

GG'AA'CACAC'A GA'TC'TC

16

<210> 57
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (5), (8), (10) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò,

<220>
 <400> 57
 CGG'AA'CACAC 'AGA'TC'TC

17

<210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (4), (6), (11), (14), (16) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò,

<220>
 <400> 58
 CGG'AA'CACAC 'AGA'TC'TCC

18

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (5), (7), (12), (15), (17) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò,

<220>
 <400> 59
 CCGG'AA'CACA C'AGA'TC'TC

18

<210> 60
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <222> (5), (7), (11), (14), (16) là axit nucleic dạng cầu khóa
 <223> Đoạn dò,

<220>
 <400> 60
 CCGG'AA'CACA C'AGA'TC'TCC

19

<210> 61

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

<220>
 <400> 61
 TGAGCGCGGC TACAGCTT

18

<210> 62
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 62
 TCCTTAATGT CACGCACGAT TT

22

<210> 63
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 63
 ATGCCTGAGA GGGAAATGAG GGC

23

<210> 64
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> HLA-A
 <220>
 <223> plasmit tái tổ hợp

<220>
 <400> 64
 GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCACCACAT CCGTGTCCCG GCCCGGCCGC GGGGAGCCCC 60
 GCTTCATCGC CGTGGGCTAC GTGGACGACA CGCAGTTCGT GCGGTTTCGAC AGCGACGCCG 120
 CGAGCCAGAG GATGGAGCCG CGGGCGCCGT GGATAGAGCA GGAGAGGCCT GAGTATTGGG 180
 ACCAGGAGAC ACGGAATGTG AAGGCCCACT CACAGATTGA CCGAGTGGAC CTGGGGACCC 240
 TGC GCGGCTA CTACAACCAG AGCGAGGCCG 270

<210> 65
 <211> 532
 <212> ADN

<213> HLA-B
 <220>
 <223> plasmit tái tổ hợp

<220>
 <400> 65
 GGTATTTCTA CACCGCCATG TCCCGGCCCG GCCGCGGGGA GCGCCGCTTC ATCGCAGTGG 60
 GCTACGTGGA CGACACCCAG TTCGTGAGGT TCGACAGCGA CGCCGCGAGT CCGAGGATGG 120
 CGCCCCGGGC GCCATGGATA GAGCAGGAGG GGCCGGAGTA TTGGGACCGG AACACACAGA 180
 TCTCCAAGAC CAACACACAG ACTTACCGAG AGAGCCTGCG GAACCTGCGC GGCTACTACA 240
 ACCAGAGCGA GGCCGGTGAG TGACCCCGGC CCGGGGCGCA GGTCACGACT CCCCATCCCC 300
 CACGTACGGC CCGGGTCGCC CCGAGTCTCC GGGTCCGAGA TCCGCCCCCG TGAGGCCGCG 360
 GGACCCGCCC AAACCCTCGA CCGGCGAGAG CCCCAGGCGC GTTTACCCGG TTTCATTTTC 420
 AGTTGAGGCC AAAATCCCCG CGGGTTGGTC GGGGCGGGGC GGGGCTCGGG GGACGGGGCT 480
 GACCGCGGGG CCGGGGCCAG GGTCTCACAT CATCCAGAGG ATGTATGGCT GC 532

<210> 66
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> beta-actin
 <220>
 <223> plasmit tái tổ hợp

<220>
 <400> 66
 TGAGCGCGGC TACAGCTTCA CCACCACGGC CGAGCGGGAA ATCGTGCGTG ACATTAAGGA 60

<210> 67
 <211> 158
 <212> ADN
 <213> HLA-A
 <220>
 <223> plasmit tái tổ hợp

<220>
 <400> 67
 CTCCCACTCC ATGAGGTATT TCTACACCTC CCACTCCATG AGGTATTTCT TCACCTCCCA 60
 CTCCATGAGG TATTTCTCCA CGCAGGAGAG GCCTGAGTAT TGACCAGGAG ACACGGAATG 120
 TGAAGGCCCA CTCACAGATT GACCGAGTGG ACCTGGGG 158

<210> 68
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> HLA-A
 <220>
 <223> plasmit tái tổ hợp

<220>
 <400> 68
 GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCACCACAT CCAGCAGGAG GGGCCGGAGT ATTGCAGGAG 60

GGTCCGGAGT ATTGCAGGAG GAGCCGGAGT ATTGACCAGG AGACACGGAA TGTGAAGGCC 120
CACTCACAGA TTGACCGAGT GGACCTGGGG 150

<210> 69
<211> 128
<212> ADN
<213> HLA-A
<220>
<223> plasmit tái tổ hợp

<220>
<400> 69
GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCACCACGC AGGAGAGGCC TGAGTATTGG CCCAGTCACA 60
GACTGACCGA GTGGACCTGG GGACCCTGGG CCCACTCACA GACTGACCGA GAGAACCTGG 120
GGACCCTG 128

<210> 70
<211> 160
<212> ADN
<213> HLA-B
<220>
<223> plasmit tái tổ hợp

<220>
<400> 70
AGCGACGCCG CGAGTCCGAG GACGGAGCCC GCCGCGAGTC CGAGAGAGGA GCCCGCCGCG 60
AGTCCGAGAG GGGAGCCGTA TTGGGACCGG AACACACAGA TCTCCAAGAC CAACACACAG 120
ACTTACCGAG AGAGCCTGCG GAACCTGCGC GGCTACTACA 160

<210> 71
<211> 172
<212> ADN
<213> HLA-B
<220>
<223> plasmit tái tổ hợp

<220>
<400> 71
GGTTCGACAG CGACGCCGCG AGTCCGAGGA TGGCGCCCCG GACCGGGAGA CACAGATCTC 60
CAAGTGAGGA TGGCGCCCCG GACCGGGAGA CACGGAACAT GGACCGGGAG ACACAGAAGT 120
ACAAGAAGAC CAACACACAG ACTTACCGAG AGAGCCTGCG GAACCTGCGC GG 172