



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0021445

(51)⁷ **C12Q 1/04, G01N 33/48**

(13) **B**

(21) 1-2017-02845

(22) 25.07.2017

(45) 26.08.2019 377

(43) 25.09.2017 354

(73) **BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG QUÂN ĐỘI 108 (VN)**

Số 1 Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Ngô Tất Trung (VN), Lê Hữu Song (VN), Trần Thị Thanh Huyền (VN), Đào Phương Giang (VN), Phan Quốc Hoàn (VN), Đào Thanh Quyên (VN)

(54) **QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN CALR VÀ CẬP MÔI DÙNG TRONG QUY TRÌNH NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình xác định đột biến gen CALR để trợ giúp cho việc chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy ác tính, theo đó, quy trình theo sáng chế có khả năng phát hiện được độc lập hoặc đồng thời cả hai loại đột biến gen CALR là đột biến mất đoạn 52bp (typ 1) và đột biến thêm đoạn 5bp (typ 2) trên cơ sở các đoạn môi và các đầu dò đặc hiệu. Quy trình theo sáng chế cho phép giảm được số lượng các xét nghiệm đồng thời tăng hiệu quả xét nghiệm cũng như đánh giá được mức độ đột biến gen CALR liên quan đến hội chứng tăng sinh tủy ác tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình xác định đột biến gen CALR để hỗ trợ chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy ác tính bằng kỹ thuật PCR.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng tăng sản tủy là một dạng rối loạn dị dòng của hệ huyết học, bao gồm các bệnh lý: bạch cầu tủy mạn, đa hồng cầu (polycythemia vera), hội chứng xuất huyết tăng tiểu cầu nguyên phát (essential thrombocytosis) và hội chứng xơ tủy (idiopathic myelofibrosis). Ngoài ra còn có các thể bệnh loạn sản tủy không điển hình khác như: hội chứng tăng bạch cầu ái toan, tăng bạch cầu ái kiềm và các hội chứng tăng bạch cầu hạt khác.

Tuy có tên chung là hội chứng tăng sản tủy, nhưng chúng có các phân typ khác nhau mang các đặc điểm di truyền học khác nhau và phác đồ điều trị cũng khác nhau. Ngoài các thông số huyết học đặc trưng của từng phân typ như sự gia tăng huyết sắc tố, sự tăng sản tiểu cầu, hay sự gia tăng quá mức tế bào nhân khổng lồ, đột biến gen JAK2 là một đặc điểm di truyền học nổi bật của 3 phân typ bệnh này. Các nghiên cứu dịch tễ học cho thấy có khoảng từ 90 đến 100% bệnh nhân bị mắc đa hồng cầu, trên 50% bị tăng sản tiểu cầu và trên 65% gia tăng quá mức tế bào megakaryocyte đều mang đột biến gen JAK2 tại vị trí V617F (Levine, Pardanani et al. 2007).

Theo hướng dẫn mới nhất của mạng lưới bạch cầu châu Âu, đột biến gen Jak2 là chỉ tiêu chính trong chẩn đoán các hội chứng tăng sản tủy thuộc các phân typ: đa hồng cầu, hội chứng xuất huyết tăng tiểu cầu nguyên phát và hội chứng xơ tủy không mang đột biến gen JAK2 (Barbui, Barosi et al. 2011). Tuy nhiên, tại Việt nam cũng như trên thế giới tỷ lệ bệnh nhân không mang đột biến gen này vào khoảng từ 20 đến 40%, vì thế gây khó khăn trong chẩn đoán và điều trị.

Điều may mắn là trong những năm gần đây người ta phát hiện thấy sự xuất hiện của đột biến gen CALR trên các nhóm hội chứng tăng sản tủy không mang

đột biến JAK2, vì thế đột biến CALR nhanh chóng trở thành một tiêu chí chẩn đoán bệnh này (Nangalia, Massie et al. 2013, Tefferi, Thiele et al. 2014). Tuy nhiên, việc xác định đột biến gen CALR đang gặp những khó khăn nhất định. Các nghiên cứu gần đây nhất đều cho thấy đột biến gen CALR xuất hiện ở khoảng từ 67 đến 70% bệnh nhân mang hội chứng tăng tiểu cầu nguyên phát và từ 84 đến 88% bệnh nhân hội chứng xơ tủy không mang đột biến gen JAK2. Tổng tần suất đột biến CALR chiếm khoảng 8-10% tổng số các ca tăng sinh tủy (Klampfl, Gisslinger et al. 2013, Nangalia, Massie et al. 2013). Cho đến nay đã có trên 19 thể đột biến khác nhau của CALR được ghi nhận, trong số này thể đột biến CALR mất đoạn 52bp (typ 1) và đột biến CALR thêm đoạn 5 bp TTGTC (typ 2) chiếm tỷ lệ hơn 80% số trường hợp đột biến CALR. Trong khi đó đột biến CALR lại được chỉ định thường quy trong chẩn đoán các thể khác nhau của hội chứng tính sinh tủy ác tính.

Cũng được xếp vào nhóm hội chứng tăng sản tủy, nhưng các bệnh nhân bạch cầu tủy mạn không mang đột biến gene JAK2, CALR mà thay vào đó là chuyển đoạn gen hình thành nên nhiễm sắc thể Philadelphia (BCR/ABL). Khi có chuyển đoạn gen này thì bệnh nhân được chỉ định điều trị đặc hiệu bằng imatinib – một thuốc đặc hiệu ức chế tyrosin kinase (Baccarani, Saglio et al. 2006). Trong khi đó nhóm bệnh nhân mắc hội chứng tăng bạch cầu ái toan lại được đặc trưng bởi chuyển đoạn gen FIP1L1-PDGFR. Chuyển đoạn này cũng là một dấu ấn giúp tiên lượng bệnh nhân đáp ứng tốt với phác đồ điều trị đích sử dụng imatinib (Cools, DeAngelo et al. 2003). Chính vì vậy, hướng dẫn thực hành lâm sàng mới nhất do Mạng lưới bạch cầu châu Âu ban hành khuyến cáo sử dụng imatinib cho các trường hợp bệnh nhân mang hội chứng tăng sản tủy dương tính với nhiễm sắc thể Philadelphia (Ph-1 positive) hoặc chuyển đoạn FIP1L1-PDGFR (Cools, DeAngelo et al. 2003, Baccarani, Saglio et al. 2006, Barbui, Barosi et al. 2011). Các phân typ còn lại của hội chứng tăng sản tủy đều được chỉ định sử dụng các thuốc có chức năng phá hủy hồng cầu, hoặc tiểu cầu như hydroxyurea hoặc interferon alpha ở liều lượng khác nhau (Barbui, Barosi et al. 2011).

Như vậy, cùng với các xét nghiệm chẩn đoán chuyển đoạn gen BCR-ABL và FIP1L1-PDGFR thì việc xác định trạng thái đột biến gen JAK2 và CALR là bắt buộc trong chẩn đoán bệnh cũng như lựa chọn chỉ định phác đồ điều trị thích hợp, theo dõi đáp ứng điều trị cho các phân typ khác nhau của hội chứng tăng sản tủy.

Tuy nhiên, do đột biến gen CALR có hai dạng là đột biến mất đoạn 52bp và đột biến thêm đoạn 5bp, nên việc xét nghiệm đột biến gen này cần có những đoạn mồi đặc hiệu cho phép xác định được hai đột biến này. Hiện các phương pháp phát hiện phải sử dụng các phương pháp như giải trình tự hoặc sử dụng các đoạn mồi có tính đặc hiệu thấp chỉ cho phép phát hiện được các đột biến ở mức cao (trên 1%). Do đó, cần có một quy trình nhằm phát hiện được đột biến gen CALR nhanh chóng, đặc hiệu và hiệu quả để trợ giúp cho quá trình chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy ác tính.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích trên, các tác giả đã cải tiến các đoạn mồi cho phép bắt cặp đặc hiệu được với cả đột biến mất đoạn 52bp và đột biến thêm đoạn 5bp của gen CALR, đồng thời cải tiến các đầu dò bằng cách bổ sung các axit nucleic khóa nhằm tăng mức độ phát hiện đột biến gen CALR bằng kỹ thuật PCR. Theo đó, sáng chế đề xuất quy trình xác định đột biến gen CALR để chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy ác tính bằng kỹ thuật PCR, cặp mồi và các đầu dò phân tử dùng trong quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định đột biến gen CALR typ1, typ2 bằng kỹ thuật PCR, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Thu ADN tổng số từ bệnh phẩm là máu hoặc tủy xương bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số từ bệnh phẩm máu theo quy trình chuẩn;

b) Khuếch đại gen CALR bằng PCR với các thành phần phản ứng bao gồm 5μl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8, 8,50mM KCl, 0,1% Triton X-10,

200 μ M dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2 μ M mỗi và từ 1,5 đến 5pM/ μ l đầu dò phân tử và nước vừa đủ thể tích 25 μ l, trong đó:

- mỗi xuôi là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;
- mỗi ngược là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3;
- đầu dò phân tử là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11; và

c) Kết luận sự đột biến của gen CALR trên cơ sở biểu đồ phát huỳnh quang thu được từ phản ứng PCR định lượng.

Theo một khía cạnh ưu tiên, đột biến gen CALR được xác định bằng quy trình theo sáng chế là là đột biến mất đoạn 52 bp hoặc đột biến thêm đoạn 5bp có trình tự tương ứng nêu trong SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.13 hoặc đồng thời cả hai đột biến này.

Theo một phương án ưu tiên, để phát hiện đột biến gen CALR mất đoạn 52 bp, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến gen CALR bao gồm các bước :

a) Thu ADN tổng số từ bệnh phẩm là máu hoặc tủy xương bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số từ bệnh phẩm máu theo quy trình chuẩn;

b) Khuếch đại gen CALR bằng PCR với các thành phần phản ứng bao gồm 5 μ l ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8, 8,50mM KCl, 0,1% Triton X-10, 200 μ M dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2 μ M mỗi và nước vừa đủ thể tích 25 μ l, trong đó:

- mỗi xuôi là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;

- mỗi ngược là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3;

c) Kết luận sự đột biến của gen CALR trên cơ sở hoặc trên cơ sở kết quả điện di trên gel agarosa 2% với các băng có kích thước 115 bp, 128 bp, 167 bp và 185 bp.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến cặp mỗi duple trong quy trình xác định đột biến gen CALR theo sáng chế, trong đó cặp mỗi này bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến đầu dò phân tử duple trong quy trình xác định đột biến gen CALR typ 1, typ 2 theo sáng chế, trong đó đầu dò phân tử này bao gồm trình tự nucleotit bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11.

Trong đó:

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.4 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 15 và 17 của SEQ ID NO.5 là axit nucleic khóa.

T' tại các vị trí 11, 12 và 14 của SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 là axit nucleic khóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả so sánh trình tự gen đối với gen đột biến mất đoạn 52bp, thêm đoạn 5bp và trình tự gen không đột biến.

Hình 2 là kết quả điện di trên gel agarosa 2% cho phép phát hiện các trường hợp đột biến mất đoạn 52bp, thêm đoạn 5bp và không đột biến.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các ký hiệu được sử dụng trong bản mô tả đối với trình tự nucleotit là ký hiệu chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và thống nhất với quy định đối với danh mục trình tự của WIPO (wipo.int/wipostad/en/standards/), ví dụ "A" có nghĩa là adenin, "G" là guanin, "C" là cytosin và "T" là thymine.

Axit nucleic 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 ribosa của axit nucleic này được bổ sung thêm một liên kết 2'oxy và 4'cacbon.

Axit nucleic 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 khóa mang đầy đủ tính bắt cặp Watson-Crick của axit nucleic thông thường, ngoài ra các trình tự chứa axit nucleic 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 (đột biến) 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 khóa, các ký hiệu A', G', C' và T' được sử dụng trong trình tự nhằm chỉ các axit nucleic 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.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định đột biến gen CALR, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu ADN tổng số từ bệnh phẩm; b) khuếch đại gen CALR bằng PCR; và c) kết luận về sự đột biến của gen CALR.

Trong bước thu ADN tổng số từ bệnh phẩm, mẫu bệnh phẩm là mẫu máu hoặc mẫu tủy xương được tách ADN bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số từ bệnh phẩm máu theo quy trình chuẩn. Các phương pháp chiết ADN này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và không bị hạn chế bởi các quy trình cụ thể. ADN thu được

Trong bước khuếch đại gen CALR bằng PCR, tiến hành PCR với các thành phần phản ứng bao gồm 5µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8, 8,50mM KCl, 0,1% Triton X-10, 200µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2µM mỗi và từ 1,5 đến 5pM/µl đầu dò phân tử và nước vừa đủ thể tích 25µl, trong đó:

- mỗi xuôi là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 sau:

ACAAATGAAGGACAAACAGGACGA

SEQ ID NO.1

CAGGCAGCAGAGAAACAAATGAAG SEQ ID NO.2

- mỗi ngược là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 sau:

GGGGACATCTTCCTCCTCATCT SEQ ID NO.3

- đầu dò phân tử là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 hoặc SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 sau:

CAGGACGAGGA'GC'AGAGGAC SEQ ID NO.4

CAAACAGGACGAGGA'GC'AGAGGAC SEQ ID NO.5

CAGGACGAGGAGCAGAGGACAAGG SEQ ID NO.6

CAGAGGACAAT'T'GT'CGGAGGAT SEQ ID NO.7

CAGAGGACAAT'T'GT'CGGAGGATGATGAGG SEQ ID NO.8

CAGAGGACAATTGTCGGAGGATGATGAGG SEQ ID NO.9

CAGGACGAGGA'GC'AGATGAC SEQ ID NO.10

CAGGACGAGGA'GC'AGATGA SEQ ID NO.11

Trong đó:

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.4 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 15 và 17 của SEQ ID NO.5 là axit nucleic khóa.

T' tại các vị trí 11, 12 và 14 của SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 là axit nucleic khóa.

Cặp mỗi SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.3 có khả năng bắt cặp không đặc hiệu vào thể đại hoặc thể đột biến. Trong trường hợp chỉ có thể đại, sản phẩm khuếch đại là 167 bp, trong trường hợp thể đột biến là mất đoạn 52bp (typ 1), sản phẩm khuếch đại sẽ là 115bp.

Cặp mỗi SEQ ID NO.2/SEQ ID NO.3 có khả năng bắt cặp không đặc hiệu vào thể đại hoặc thể đột biến. Trong trường hợp chỉ có thể đại, sản phẩm khuếch đại là 180 bp, trong trường hợp thể đột biến là mất đoạn 52bp (typ 1), sản phẩm khuếch đại sẽ là 128bp.

Các đầu dò phân tử theo sáng chế được thiết kế để có khả năng bắt cặp đặc

hiệu với cả thể đại hoặc thể đột biến của cả trường hợp đột biến mất đoạn 52bp hoặc đột biến thêm đoạn 5bp. Do đó, phương pháp theo sáng chế có khả năng xác định được đồng thời cả đột biến mất đoạn 52bp hoặc đột biến thêm đoạn 5bp mà không cần thực hiện nhiều thử nghiệm xác định độc lập.

Theo một khía cạnh ưu tiên, đột biến gen CALR được xác định bằng quy trình theo sáng chế là là đột biến mất đoạn 52 bp hoặc đột biến thêm đoạn 5bp có trình tự tương ứng nêu trong SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.13 hoặc đồng thời cả hai đột biến này.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến cặp mỗi dùng trong quy trình xác định đột biến gen CALR theo sáng chế, trong đó cặp mỗi này bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 sau:

ACAAATGAAGGACAAACAGGACGA	SEQ ID NO.1
CAGGCAGCAGAGAAACAAATGAAG	SEQ ID NO.2
GGGGACATCTTCCTCCTCATCT	SEQ ID NO.3

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến đầu dò phân tử dùng trong quy trình xác định đột biến gen CALR theo sáng chế, trong đó đầu dò phân tử này bao gồm trình tự nucleotit bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 sau:

CAGGACGAGGA'GC'AGAGGAC	SEQ ID NO.4
CAAACAGGACGAGGA'GC'AGAGGAC	SEQ ID NO.5
CAGGACGAGGAGCAGAGGACAAGG	SEQ ID NO.6
CAGAGGACAAT'T'GT'CGGAGGAT	SEQ ID NO.7
CAGAGGACAAT'T'GT'CGGAGGATGATGAGG	SEQ ID NO.8
CAGAGGACAATTGTCGGAGGATGATGAGG	SEQ ID NO.9
CAGGACGAGGA'GC'AGATGAC	SEQ ID NO.10
CAGGACGAGGA'GC'AGATGA	SEQ ID NO.11

Trong đó:

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.4 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 15 và 17 của SEQ ID NO.5 là axit nucleic khóa.

T' tại các vị trí 11, 12 và 14 của SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8 là axit nucleic khóa.

A' và C' tại vị trí 11 và 13 của SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 là axit nucleic khóa.

Axit nucleic 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 này được bổ sung thêm một liên kết 2'oxy và 4'cacbon. Axit nucleic khóa là nucleitit có liên kết 2'-O,4'-C-methylene-beta-D-ribofuranosyl và kỹ thuật tạo ra trình tự axit nucleic chứa axit nucleic khóa này là đã biết và đã được đề cập và có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật, ví dụ (Birte Vester and Jesper Wengel, Biochemistry Volume 43, Number 42 October 26, 2004). Đầu dò phân tử chứa các axit nucleic khóa theo sáng chế có khả năng bắt cặp rất đặc hiệu với các chuỗi ADN tạo ra dạng LNA/ADN bền với nhiệt ở dạng đột biến mất đoạn 52bp hoặc dạng đột biến thêm đoạn 5bp, do đó, kết quả thu được trên biểu đồ huỳnh quang cho phép xác định được chính xác các dạng đột biến của gen CALR.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Xác định đột biến gen CALR để hỗ trợ trong chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy

Để xác định đột biến gen CALR, tiến hành thử nghiệm với 35 mẫu bệnh phẩm máu ngoại vi từ bệnh nhân nghi ngờ mắc các hội chứng tăng sinh tủy ác tính với các biểu hiện như: tăng tiểu cầu nguyên phát, tăng sinh tủy hoặc đa hồng cầu với các chỉ số cận lâm sàng như sau:

- Hemoglobin (Hgb) $\geq 18,5$ g/dl với nam hoặc $\geq 16,5$ g/dl với nữ, hoặc
- Tiểu cầu (Platelet count) $\geq 450109/l$
- Có hiện tượng tăng sinh dòng Megakaryocyte và có hình thái bất thường đi kèm với sự ngưng kết reticulin hoặc các sợi collagen dưới kính trường.

Khi đó, 250ul từ mỗi bệnh phẩm máu được dùng cho mục đích tách ADN tổng số và thôi trong 100ul 25mM Tris-HCl pH8,0, nồng độ ADN bệnh phẩm sẽ

ở mức 100-260ng/ul.

Các thử nghiệm được tiến hành nhằm xác định đột biến gen CALR bằng kỹ thuật giải trình tự, PCR điện di nhằm phân biệt đoạn gãy, xác định đột biến mất đoạn 52bp và thêm đoạn 5pb bằng kỹ thuật realtime PCR sử dụng các đoạn mồi theo sáng chế.

Mẫu máu hoặc mẫu tủy xương được chiết bằng kit tách ADN tổng số của hãng Qiagen (Đức) theo phương pháp của nhà sản xuất.

Các thử nghiệm được tiến hành lần lượt với từng mẫu của 35 mẫu bệnh phẩm. Thử nghiệm 1 được thực hiện bằng phương pháp điện di phân biệt đoạn gãy bằng cách tiến hành PCR với các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3. Thử nghiệm 2 được thực hiện bằng phương pháp realtime PCR với các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3 và đầu dò phân tử có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4. Thử nghiệm 3 được thực hiện bằng phương pháp realtime PCR với các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3 và đầu dò phân tử có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 và thử nghiệm 4 được thực hiện với các đoạn mồi nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3 và hai đầu dò phân tử có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.7.

Tiến hành PCR với các thành phần phản ứng bao gồm 5µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8, 8,50mM KCl, 0,1% Triton X-10, 200µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2µM mồi và từ 1,5 đến 5pM/µl đầu dò phân tử và nước vừa đủ thể tích 25µl. Chu trình nhiệt được thực hiện với 45 chu kỳ. Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarosa 2% hoặc trên biểu đồ huỳnh quang realtime PCR.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên bảng sau:

Triệu chứng	Điện di phân biệt đoạn gãy	Đột biến mất đoạn 52pb	Đột biến thêm đoạn 52bp	Đột biến gen CALR
Tăng tiểu cầu	2/35	2/35	3/35	5/35
Tăng sinh tủy	0/35	0/35	2/35	2/35
Đa hồng cầu	2/35	2/35	1/35	3/35

Các nghiên cứu gần đây nhất đều cho thấy đột biến gen CALR xuất hiện ở khoảng 67-70% bệnh nhân mang hội chứng tăng tiểu cầu nguyên phát và 84-

88% bệnh nhân hội chứng xơ tủy không mang đột biến gene JAK2. Tổng tần suất đột biến CALR chiếm khoảng 8-10% tổng số các ca tăng sinh tủy. Cho đến nay đã có trên 19 thể đột biến khác nhau của CALR được ghi nhận, trong số này thể đột biến CALR mất đoạn 52bp và đột biến CALR thêm đoạn 5 bp TTGTC chiếm tỷ lệ hơn 80% số trường hợp đột biến CALR. Điều này tương ứng với tỷ lệ phát hiện các mẫu theo sáng chế.

Để kiểm tra kết quả, tiến hành giải trình tự gen để kiểm tra đột biến đối với 35 mẫu bệnh phẩm. Kết quả được thể hiện trên bảng sau:

Triệu chứng	Đột biến JAK2 V617F	Đột biến CALR mất 52bp	Đột biến CALR thêm 5bp
Tăng tiểu cầu	7/35	2/35	3/35
Tăng sinh tủy	2/35	0/35	2/35
Đa hồng cầu	16/35	2/35	1/35

Qua giải trình tự so sánh kết quả được kiểm tra bằng phương pháp theo sáng chế và kết quả kiểm tra đột biến gen cho thấy rằng các bệnh liên quan đến tăng sinh tủy ác tính (bao gồm tăng sinh tủy, tăng tiểu cầu và đa hồng cầu) chủ yếu xảy ra đối với gen JAK2 V617F, chiếm tới 25/35 mẫu. Trong khi đó, kết quả giải trình tự cũng cho thấy rằng 100% các trường hợp đột biến gen CALR đều được xác định chính xác. Điều này cho thấy mức độ đặc hiệu của các đoạn mồi được sử dụng. Các đoạn mồi này cho phép nhận được cả trường hợp đột biến mất đoạn 52bp và đột biến thêm đoạn 5bp, nhưng không nhận các trường hợp gây đột biến liên quan đến hội chứng tăng sinh tủy ác tính khác.

Trong đó, kết quả cũng cho thấy, chỉ có duy nhất một đột biến xảy ra đối với cả gen JAK2 V617F là đột biến mất đoạn 52bp. Vì vậy, nếu chỉ kiểm tra đột biến trên gen JAK2 V617F mà không kiểm tra đột biến trên gen CALR sẽ không phát hiện được hết các mẫu bị hội chứng tăng sinh tủy ác tính. Tỷ lệ kết hợp phương pháp theo sáng chế với kiểm tra đột biến trên gen CALR trong phát hiện hội chứng tăng sinh tủy ác tính đạt tới 91%.

Kết quả giải trình tự gen cho thấy, trường hợp gen CALR đột biến mất đoạn 52bp là trình tự bao gồm 509 bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.12, gen CALR đột biến thêm đoạn 5bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.13 và gen

CALR không đột biến có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14.

Kết quả điện di được thể hiện trên Hình 2 cho thấy các băng điện di cho kết quả rõ nét, dễ dàng phân biệt được các trường hợp đột biến mất hoặc không đột biến.

Ví dụ 2. Xác định mức độ phát hiện đột biến gen CALR để hỗ trợ trong chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy

Để xác định mức độ đặc hiệu của các đoạn mồi đối với ngưỡng phát hiện đột biến gen CALR. Các trình tự ADN có trình tự nêu trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14 được chuyển gắn vào plasmit và chuyển vào các chủng *E.coli* độc lập. Sau đó tiến hành tách các plasmit chứa các trình tự SEQ ID NO.12 (CALR type 1 del 52bp), SEQ ID NO.13 (CALR type 2 insert5 @TTGTC) và SEQ ID NO.14 (CALR wild type) và chuẩn đến nồng độ 10^6 plasmit/ul.

Sau đó tiến hành pha loãng các plasmit đột biến SEQ ID NO.12 (CALR type 1 del 52bp), SEQ ID NO.13 (CALR type 2 insert5 @TTGTC), trên nền plasmit thể dại SEQ ID NO.14 (CALR wild type) sao cho đạt 100000 plasmit/ul với tuy nhiên tỷ lệ của từng đột biến sẽ là 50%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01% và 0%.

Tiến hành phát hiện đột biến CALR mất đoạn 52bp hoặc đột biến CALR thêm đoạn 5 bp (TTGTC) bằng kỹ thuật realtime PCR với thành phần như sau:

Thành phần		Số lượng
CALR mất đoạn 52bp	CALR thêm đoạn 5 bp	
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix	2x QuantiTect Probe PCR Master Mix	7,5 (µl)
Mồi xuôi (SEQ ID NO.1)	Mồi xuôi (SEQ ID NO.1)	1µl of 10pmol/µl
Mồi ngược (SEQ ID NO.3)	Mồi ngược (SEQ ID NO.3)	1µl of 10pmol/µl
Đầu dò (SEQ ID NO.11)	Đầu dò (SEQ ID NO.7)	0,5µl of 5pmol/µl
ADN mẫu		100000 bản sao
Nước cất vừa đủ		15µl

Tiến hành phản ứng trên máy phản ứng realtime PCR trên máy Agilent

Mx3005P với 45 chu kỳ và ghi tín hiệu ở 60°C với cả 3 trường hợp. Các thử nghiệm được thực hiện 20 lần. Kết quả phát hiện đột biến CALR mất đoạn 52bp hoặc CALR thêm đoạn 5 bp TTGTC ở các nồng độ khác nhau được xác định với số lần phát hiện được thể hiện ở bảng sau:

	Đột biến CARL mất đoạn 52bp				
Ngưỡng	50%	10%	1%	0,1%	0,01%
Ct	25,2 ± 0,3	26,5 ± 0,6	29,2 ± 0,6	32,8 ± 0,8	37,8 ± 1,5
Tỷ lệ phát hiện đột biến CARL mất đoạn 52bp	100%	100%	100%	85%	60%
Tỷ lệ phát hiện đột biến thêm đoạn 5bp	100%	100%	100%	85%	65%
Tỷ lệ phát hiện đồng thời cả hai đột biến gen CALR	100%	100%	100%	95%	90%

Như vậy, trong các đoạn môi theo sáng chế có khả năng phát hiện đặc hiệu với độ nhạy cao, có khả năng phát hiện tổng số các đột biến có trong mẫu ở mức tới 0,01% tổng số ADN của bệnh phẩm (các đoạn môi thông thường cho phép phát hiện ở mức 0,5%). Điều này cho thấy rằng, các đoạn môi theo sáng chế cho phép nhận đặc hiệu các trình tự đột biến và cùng với việc cải tiến các đầu dò, cho phép các đầu dò phát hiện rất đặc hiệu các đột biến ngay cả các đột biến này ở mức rất thấp (0,01%) mà không bị ảnh hưởng bởi nồng độ cao của ADN không bị đột biến.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình xác định đột biến gen CALR để chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy ác tính theo giải sáng chế cho phép chẩn đoán được đột biến gen CALR mất đoạn 52bp và/hoặc thêm đoạn 5bp một cách riêng biệt hoặc đồng thời với mức độ đột biến lên tới 0,01%, điều này cho phép hỗ trợ chẩn đoán được sớm các trường hợp nghi ngờ mắc hội chứng tăng sinh tủy ác tính liên quan đến đột biến gen CALR. Phương pháp theo sáng chế có khả năng phát hiện chính xác, nhanh

chóng và đặc hiệu. Phương pháp này nếu kết hợp với phương pháp xác định đột biến gen JAK2 V617F cho phép tăng tỷ lệ xác định tỷ lệ dương tính trong chẩn đoán các hội chứng của chứng tăng sinh tủy từ mức 71% lên 81%.

Bằng cách thiết kế đoạn mồi đặc hiệu, các đoạn mồi đặc hiệu này cho phép xác định được chính xác các đột biến gen CALR mà không có hiện tượng dương tính giả, từ đây góp phần nâng cao hiệu quả phát hiện đột biến gen trong chẩn đoán hội chứng tăng sinh tủy.

Các đầu dò phân tử được thiết kế với các axit nucleotit khóa cho phép bắt cặp đặc hiệu với các axit nucleic đột biến mà không bắt cặp với các axit nucleic không đột biến làm tăng mức phát hiện từ 0,5% lên 0,01%, việc cải tiến này đặc biệt hữu ích trợ giúp cho việc chẩn đoán bệnh, cho phép phát hiện các đột biến trong giai đoạn sớm, điều này tăng hiệu quả điều trị bệnh đối với bệnh nhân bị nghi ngờ mắc hội chứng tăng sinh tủy.

Chỉ bằng một lần xét nghiệm, kỹ thuật theo sáng chế cho phép phát hiện được các đột biến gen CALR thay vì phải trải qua nhiều xét nghiệm độc lập, điều này giảm chi phí xét nghiệm và thời gian, đồng thời tăng được hiệu quả trong việc khám và chữa bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình xác định đột biến gen CALR typ1, typ2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) Thu ADN tổng số từ bệnh phẩm là máu hoặc tủy xương bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số từ bệnh phẩm máu theo quy trình chuẩn;
 - b) Khuếch đại gen CALR bằng PCR với các thành phần phản ứng bao gồm 5µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8, 8,50mM KCl, 0,1% Triton X-10, 200µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2µM mỗi và từ 1,5 đến 5pM/µl đầu dò phân tử và nước vừa đủ thể tích 25µl, trong đó:
 - mỗi xuôi là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2;
 - mỗi ngược là đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3;
 - đầu dò phân tử là đoạn nucleotit bất kỳ có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11 và
 - c) Kết luận sự đột biến của gen CALR trên cơ sở biểu đồ phát huỳnh quang thu được từ phản ứng PCR định lượng.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó đột biến gen CALR được xác định là đột biến mất đoạn 52 bp hoặc đột biến thêm đoạn 5bp có trình tự tương ứng nêu trong SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.13 hoặc đồng thời cả hai đột biến này.
3. Cặp mỗi dùng trong quy trình xác định đột biến gen CALR theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cặp mỗi này bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.
4. Đầu dò phân tử dùng để xác định đột biến gen CALR theo điểm 1 hoặc 2, trong đó đầu dò phân tử này bao gồm trình tự nucleotit bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11.

HÌNH 1

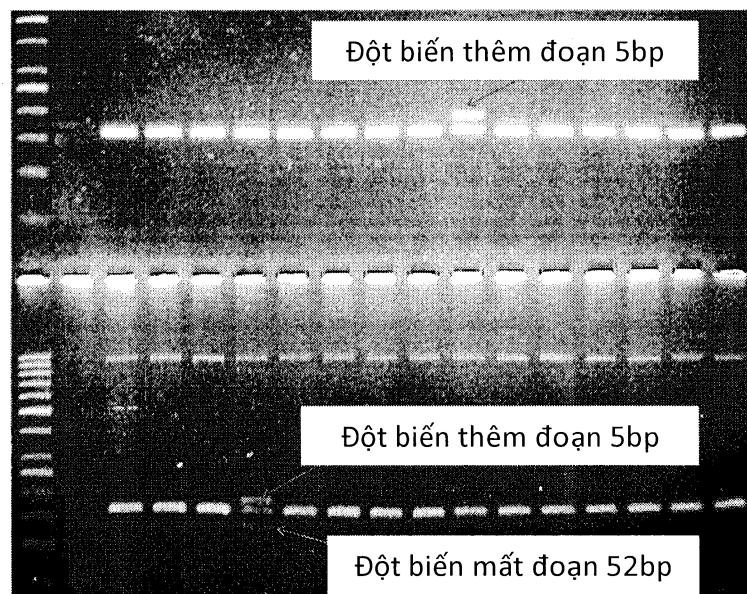
Đột biến thêm đoạn 5bp

10101	GCTCTGCCTG CAGGCAGCAG AGAACAAT GAAGGACAAA CAGGACGAGG AGCAGA GGCT TAAGGAGGAG GAAGAGACA AGAAGCGAA AGAGGAGGAG
	CGAGACGGAC GTCCGTGCTC TCTTGTITTA CTTCCTGTTT GTCTGTCTCC TCTCT CCGA ATTCTCTCTC CTTCCTCTGT TCTTTGGGTT TCTCTCTCTC
10201	GAG GCAGAGG ACAITGTCAG GAGGATGATG AGGACAAAGA TGAGGATGAG GAGGATGAGG AGGACAAGGA GGAAGATGAG GAGGAAGATG TCCCGGCGCA
	CTC CGTCTCC TGTAACAGTC CTCTACTAC TCTGTITCT ACTCTACTC CTCTACTCC TCTGTITCTT CCTTCTACTC CTCTCTAC AGGGGCGGT
10301	GGCCAAGGAC GAGCTGTAGA GAGGCTGCC TCAGGCGTG GACTGAGGCC TGAGCGCTCC TGCCGACAG CTGGCGCGC CAAATAATGT CTCTGTAGA
	CCGTTTCTG CTGACATCT CTCGGACGG AGTGCCGAC CTGACTCCGG ACTCGGAGG ACGGCGTCTC GACCGGCGC GTTTATTACA GAGACACTCT

Đột biến mất đoạn 52bp

10101	GCTCTGCCTG CAGGCAGCAG AGAACAAT GAAGGACAAA CAGGACGAGG AGCAGA GGCT TAAGGAGGAG GAAGAGACA AGAAGCGAA AGAGGAGGAG
	CGAGACGGAC GTCCGTGCTC TCTTGTITTA CTTCCTGTTT GTCTGTCTCC TCTCTCTCTC TAACAGTCTT CCTACTACTC CTCTCTAC TCTCTCTCT
10201	GGATGAGGAG GACAGGAGG AAGATGAGGA GGAAGATGTC CCGG CGCAGG CCAAGGACGA GCTGTAGAGA GGCTGCGTC CAGGGCTGGA CTGAGGCGTG
	CCTACTCTCT CTCTCTCTCC TTCTACTCTT CCTTCTACG GGG CGCTCC GTTCTCTGCT CGACATCTCT CCGGACGGAG CTCCCGAGCT GACTCGGAG

HÌNH 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Bệnh viện Trung ương quân đội 108
 <120> QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN CALR VÀ CẤP MỖI DÙNG TRONG QUY TRÌNH NÀY

<130>
 <160> 14
 <170>

<210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 24

ACAAATGAAGGACAAACAGGACGA

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 24

CAGGCAGCAGAGAAACAAATGAAG

<210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi

<220>
 <222>
 <223>
 <400> 22

GGGGACATCTTCCTCCTCATCT

<210> 4
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò phân tử

<220>

<222> (11), (13)

<223> A' và C' là axit nucleic khóa

<400> 20

caggacgagga'gc'agaggac

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò phân tử (probe)

<220>

<222> (15), (17)

<223> A' và C' là axit nucleic khóa

<400> 24

caaacaggacgagga'gc'agaggac

<210> 6

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò phân tử

<220>

<400> 24

Caggacgaggagcagaggacaagg

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò phân tử

<220>

<222> (11), (12) và (14)

<223> T' là axit nucleic khóa

<400> 22

cagaggacaat't'gt'cggaggat

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò phân tử

<220>
 <222> (11), (12) và (14)
 <223> T' là axit nucleic khóa
 <400> 29
 cagaggacaat't'gt'cggaggatgatgagg

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò phân tử

<220>
 <400> 29
 cagaggacaattgtcggaggatgatgagg

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò phân tử
 <220>
 <222> (11) (13)
 <223> A' và T' là axit nucleic khóa
 <400> 20
 CAGGACGAGGA'GC'AGATGAC

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò phân tử
 <220>
 <222> (11) (13)
 <223> A' và T' là axit nucleic khóa
 <400> 19
 CAGGACGAGGA'GC'AGATGA

<210> 12
 <211> 509
 <212> ADN
 <213>
 <220>
 <223> Đoạn gen CALR typ 1 đột biến mất đoạn 52bp

<220>
 <400> 509
 GCTGAGGAGT TTGGCAACGA GACGTGGGGC GTAACAAAGG TGAGGCCTGG TCCTGGTCCT 60
 GATGTCGGGG GCGGGCAGGG CTGGCAGGGG GCAAGGCCCT GAGGTGTGTG CTCTGCCTGC 120

AGGCAGCAGA GAAACAAATG AAGGACAAAC AGGACGAGGA GCAGAGGACA AGGAGGATGA 180
 TGAGGACAAA GATGAGGATG AGGAGGATGA GGAGGACAAG GAGGAAGATG AGGAGGAAGA 240
 TGTCCCCGGC CAGGCCAAGG ACGAGCTGTA GAGAGGCCTG CCTCCAGGGC TGGACTGAGG 300
 CCTGAGCGCT CCTGCCGCAG AGCTGGCCGC GCCAAATAAT GTCTCTGTGA GACTCGAGAA 360
 CTTTCATTTT TTTCCAGGCT GGTTCGATT TGGGGTGGAT TTTGGTTTTG TTCCCCCTCT 420
 CCACTCTCCC CCACCCCTC CCCGCCCTT TTTTTTTTTT TTTTAAACT GGTATTTTAT 480
 CTTTGATTCT CCTTCAGCCC TCACCCCTG 509

<210> 13

<211> 500

<212> ADN

<213>

<220>

<223> Đoạn gen CALR typ 2 đột biến thêm đoạn 5bp TTGTC

<220>

<400> 500

CATTCATCCT CCAGGTCAAG TCTGGCACCA TCTTTGACAA CTCCTCATC ACCAACGATG 60
 AGGCATACGC TGAGGAGTTT GGCAACGAGA CGTGGGGCGT AACAAAGGTG AGGCCTGGTC 120
 CTGGTCCTGA TGTCGGGGGC GGGCAGGGCT GGCAGGGGGC AAGGCCCTGA GGTGTGTGCT 180
 CTGCCTGCAG GCAGCAGAGA AACAAATGAA GGACAAACAG GACGAGGAGC AGAGGCTTAA 240
 GGAGGAGGAA GAAGACAAGA AACGCAAAGA GGAGGAGGAG GCAGAGGACA **ATTGTC**GGAG 350
 GATGATGAGG ACAAAGATGA GGATGAGGAG GATGAGGAGG ACAAGGAGGA AGATGAGGAG 360
 GAAGATGTCC CCGGCCAGGC CAAGGACGAG CTGTAGAGAG GCCTGCCTCC AGGGCTGGAC 420
 TGAGGCCTGA GCGCTCCTGC CGCAGAGCTG GCCGCGCCAA ATAATGTCTC TGTGAGACTC 480
 GAGAACTTTC ATTTTTTTCC 500

<210> 14

<211> 500

<212> ADN

<213>

<220>

<223> Gen CARL thể dài

<220>

<400> 500

CAACTTCCTC ATCACCAACG ATGAGGCATA CGCTGAGGAG TTTGGCAACG AGACGTGGGG 60
 CGTAACAAAG GTGAGGCCTG GTCCTGGTCC TGATGTCGGG GCGGGCAGG GCTGGCAGGG 120
 GGCAAGGCCC TGAGGTGTGT GCTCTGCCTG CAGGCAGCAG AGAAACAAAT GAAGGACAAA 180
 CAGGACGAGG AGCAGAGGCT TAAGGAGGAG GAAGAAGACA AGAAACGCAA AGAGGAGGAG 240
 GAGGCAGAGG ACAAGGAGGA TGATGAGGAC AAAGATGAGG ATGAGGAGGA TGAGGAGGAC 300
 AAGGAGGAAG ATGAGGAGGA AGATGTCCCC GGCCAGGCCA AGGACGAGCT GTAGAGAGGC 360
 CTGCCTCCAG GGCTGGACTG AGGCCTGAGC GTCCTGCCG CAGAGCTGGC CGCGCCAAAT 420
 AATGTCTCTG TGAGACTCGA GAACTTTCAT TTTTTTCCAG GCTGGTTCCG ATTTGGGGTG 480
 GATTTTGGTT TTGTTCCCCT 500