



(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) 
1-0021448

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **B**

(21) 1-2018-02396

(22) 04.06.2018

(45) 26.08.2019 377

(43) 27.08.2018 365

(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), Trần Thị Thanh Huyền (VN), Phan Quốc Hoàn (VN), Lê Hữu Song (VN), Mai Hồng Bằng (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN TERT**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen TERT để chẩn đoán bệnh ung thư không xâm lấn, quy trình theo sáng chế bao gồm các bước: a) thu ADN tổng số; b) khuếch đại gen bằng PCR bất đối xứng, c) tinh sạch sản phẩm PCR; và d) phát hiện đột biến gen để xác định mức độ đột biến gen tại vị trí G124 và G146 của gen TERT để từ đó giúp chẩn đoán bệnh ung thư nguyên phát như tế bào gan, ung thư mô đệm thần kinh, ung thư tuyến giáp, ung thư da và ung thư bàng quang. Bằng cách sử dụng thêm các đoạn peptit kẹp phân tử đặc hiệu, quy trình theo sáng chế cho phép phát hiện các đột biến gen TERT với ngưỡng phát hiện 1%.

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 phát hiện đột biến vùng trình tự khởi đầu của gen TERT để ứng dụng trong việc hỗ trợ chẩn đoán ung nguyên phát tế bào gan, ung thư mô đệm thần kinh, ung thư tuyến giáp, ung thư da và ung thư bàng quang dựa trên cơ sở phát hiện đột biến gen TERT từ máu ngoại vi, nước tiểu hoặc dịch não tủy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây đột biến vùng khởi động gen TERT (telomerase reverse transcriptase: TERT) đã được mô tả trên một số thể ung thư như ung thư da 71%, ung thư bàng quang 76 %, ung thư tuyến giáp 20-86%, u nguyên bào thần kinh 54% và ung thư biểu mô tế bào gan 59-68%. Các đột biến gen TERT này thường xảy ra tại vị trí 124 và 146 phía trước codon khởi đầu dịch mã (ATG). Chúng hình thành các điểm gắn kết mới (CCGGAA hoặc CCGGAT) cho yếu tố phiên mã ETS/TCF và làm tăng hoạt tính khởi động gen TERT. Đối với UBTG, đột biến gen TERT đã được ghi nhận ở 59-68% khối u gan và hầu hết (95%) xảy ra tại vị trí G124A). Đột biến gen TERT cho thấy không xảy ra tại các exon, tuy nhiên chỉ với tần suất xuất hiện rất thấp tại vùng khởi động thì đột biến này lại là nguyên nhân gây tổn thương di truyền thường gặp nhất được mô tả trên UBTG. Bên cạnh đó, gen TERT còn có thể bị tổn thương bởi hiện tượng tích hợp bộ gen virus HBV, sự tích hợp này làm tăng hoạt tính telomeraza – một đặc trưng kinh điển của hầu hết tế bào u. Hiện tượng tăng hoạt tính telomeraza trong tế bào ung thư gan còn được lý giải bởi hiện tượng tăng số bản sao của gen TERT, xuất hiện ở khoảng 5 - 6% UBTG.

Trên cơ sở những số liệu đó, Nault và cộng sự đã tiến hành đánh giá mức độ ảnh hưởng của đột biến gene TERT đối với việc chẩn đoán phân biệt xơ gan -UBTG giai đoạn sớm. Theo Nault, tần suất xuất hiện của đột biến gen TERT thay đổi rất rõ giữa các nhóm bệnh lý gan do HBV: 6% ở nhóm bệnh nhân mang hạch loạn sản mức độ thấp (low-grade dysplastic nodules –LGDN, 29% ở nhóm mang hạch loạn sản mức độ cao (high-grade dysplastic nodules) và 61% ở nhóm UBTG giai đoạn sớm.

Điều đặc biệt là Nault chỉ sử dụng kỹ thuật kinh điển của giải trình tự gen (Sanger sequencing) để xác định đột biến gene TERT trên các khối mô ung thư nguyên phát tế bào gan nên mức độ phát hiện đột biến thấp.

Phương pháp giải trình tự gen cũng được dùng trong các nghiên cứu phát hiện đột biến gen TERT trên các khối u của bệnh nhân ung thư da và u tuyến giáp.

Cho đến nay việc chẩn đoán ung thư không xâm lấn dựa trên trạng thái đột biến gen TERT đã được thực hiện với các mẫu nước tiểu để chẩn đoán u bàng quang, dịch não tủy cho chẩn đoán u não, tuy nhiên kỹ thuật sử dụng phát hiện đột biến gen TERT vẫn chỉ là giải trình tự gen kinh điển (Sanger sequencing), trong khi đó đây lại là kỹ thuật có độ nhạy thấp, phương pháp này chỉ có thể phát hiện đột biến khi tỷ lệ đoạn AND mang đột biến chiếm ít nhất 25% lượng ADN bệnh phẩm. Ngoài ra, như đã đề cập đột biến gen TERT chỉ tập trung tại 01 vị trí (chiếm 95% số trường hợp), vị trí còn lại chỉ chiếm 6%. Điều này gợi ý có thể thiết lập các phương pháp gián tiếp khác, thân thiện hơn cho mục đích phát hiện đột biến gen TERT cho mục đích hỗ trợ chẩn đoán một số bệnh lý ác tính dựa trên cơ sở phát hiện các phân tử AND mang đột biến gen này từ máu ngoại vi, nước tiểu hoặc dịch não tủy.

Do đó, cần có phương pháp cải tiến để tăng mức độ phát hiện đột biến gen TERT nhằm hỗ trợ chẩn đoán sớm bệnh ung thư trên cơ sở đột biến gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích trên, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện đột biến gen TERT để chẩn đoán bệnh ung thư không xâm lấn, các đoạn môi, peptit kẹp phân tử và các đầu dò dùng trong phương pháp này trên cơ sở khuếch đại gen bằng PCR và giải trình tự để xác định các điểm đột biến G124 và G146 của gen TERT. Trong đó phương pháp theo sáng chế sử dụng các đoạn peptit kẹp phân tử có trình tự tối ưu cho bắt cặp bổ sung với trình tự gen TERT thể đại ở bước PCR, sự có mặt của các peptit kẹp phân tử phù hợp sẽ “kẹp” và ức chế sự nhân lên của các phân tử thể đại, nhờ đó PCR sẽ tập trung khuếch đại và làm giàu thể đột biến, từ đó tăng được ngưỡng phát hiện đột biến.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến gen TERT để chẩn đoán bệnh ung thư không xâm lấn, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số cho bệnh phẩm mô tươi hoặc sử dụng xelen, hoặc bằng kit dùng riêng cho mẫu bệnh phẩm vùi trong khối nền theo quy trình chuẩn;

b) khuếch đại gen TERT bằng PCR đa môi bất đối xứng với thành phần phản ứng bao gồm: 5 µl 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, từ 1,5 đến 5 pM/ μ l peptit kẹp phân tử, đầu dò và nước vừa đủ thể tích 25 μ l, trong đó:

- mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.2 hoặc SEQ ID NO.3;
- mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.5;
- peptit kẹp phân tử là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.6, SEQ ID. NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID. NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14;

c) tinh sạch sản phẩm PCR bằng cách bổ sung 250ml 10mM tris-HCl, pH=8,8 và 0,4 ml dung dịch phenol, cloroform isoamylalcohol 25:24:1 rồi ly tâm trong 20 phút thu dịch nổi, sau đó bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 0,7/1 (v/v) và ly tâm tiếp trong 30 phút thu kết tủa rồi rửa sạch bằng cồn 75% thu được sản phẩm PCR tinh sạch; và

d) phát hiện đột biến gen bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR tinh sạch thu được từ bước c) dựa trên kết quả phát hiện đột biến tại vị trí G124 và/hoặc 146G để đưa ra kết luận về mức độ đột biến gen TERT.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến các đoạn mỗi dùng trong phương pháp theo sáng chế, trong đó:

- mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.2 hoặc SEQ ID NO.3;
- mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.5.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến các đoạn peptit kẹp phân tử dùng trong phương pháp theo sáng chế, trong đó các đoạn peptit kẹp phân tử này là peptit axit nucleic (peptit nucleic acid: PNA) có trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.6, SEQ ID. NO.7 và SEQ ID NO.8.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến các các đoạn peptit kẹp phân tử là dạng axit nucleic khóa phân tử (locked nucleic acid: LNA), trong đó axit nucleic khóa này là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID. NO.11;

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến các các đoạn peptit kẹp phân tử là dạng axit nucleic cầu nối (bridged nucleic acid: BNA), trong đó đoạn axit nucleic cầu nối này là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Kết quả giải trình tự bằng kỹ thuật thể hiện mức độ ảnh hưởng của nồng độ

peptit kẹp phân tử đến khả năng phát hiện đột biến gen TERT.

Hình 2: Kết quả xác định ngưỡng tối thiểu của lượng peptit kẹp phân tử cần để phát hiện đột biến gen TERT trên bệnh phẩm bệnh nhân ung thư.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế dựa trên kỹ thuật PCR giải trình tự để phát hiện các đột biến của gen TERT. Gen Telomerase reverse transcriptase (TERT) đã được giải trình tự và có số truy cập trong ngân hàng gen là NG_009265. Theo các nghiên cứu cho thấy rằng, các đột biến liên quan đến các bệnh lý ác tính đều có liên quan đến vị trí -124 (-124G > A), 146 (-146G > A) phía trước codon khởi đầu dịch mã. Dựa trên điều này, các tác giả sáng chế đã tìm ra các đoạn mồi đặc hiệu và kết hợp với các trình tự peptit kẹp phân tử đặc hiệu để ức chế phân tử thể đại trong quá trình nhân gen TERT, từ đó xây dựng và hoàn thiện được quy trình phát hiện đột biến gen TERT.

Vật chất di truyền tổng hợp nhân tạo (Synthetic genetic polymers – hay xeno-nucleic acids - XNA): Là những đồng đẳng của axit nucleic, trong đó gốc riboza của axit nucleic, hoặc các bazơ nitơ hoặc liên kết phosphodiester đã được cải biến, nhưng vẫn đảm bảo duy trì sự bắt cặp giữa các cầu nối hydro giữa một gốc pyridin với một gốc purin (Qian Ma, Danence Lee và cộng sự - Polym. Chem. 2016 10.1039/c6py01075j). Một XNA điển hình đã biết là peptit axit nucleic (peptide nucleic acid: PNA) hay còn được gọi là peptit kẹp phân tử được sử dụng theo sáng chế là một dạng polyme nhân tạo đồng đẳng với các chuỗi axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN), cấu trúc dạng đồng đẳng này đã được Neilsen (Trường đại học Copenhagen) đề cập từ năm 1991.

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 (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.

Axit nucleic cầu nối (Bridged nucleic acid – BNA) là các axit ribonucleic đã được sửa đổi, các phân tử này được tổng hợp lần đầu tiên bởi Satoshi Obika và cộng sự (Satoshi Obika and et al Tetrahedron Letters, Volume 38, Issue 50, 15 December 1997, Pages 8735-8738), (Yasunori Mitsuoka et al Nucleic Acids Res. 2009 Mar; 37(4): 1225–1238): Các monome BNA có thể là những cấu trúc cầu nối chứa năm, sáu hoặc bảy gốc với một vết nứt đường C3'-endo "cố định". Cấu trúc này được kết hợp tổng hợp ở vị trí 2' và 4' của riboza để tạo ra monomer 2', 4'-BNA.

Trừ khi có quy định khác, theo sáng chế, để phân biệt axit nucleic thông thường với axit nucleic cầu nối, các ký hiệu A", G", C" và T" được sử dụng trong trình tự nhằm chỉ các axit nucleic cầu nối, nghĩa là có thể là những cấu trúc cầu nối chứa năm, sáu hoặc bảy gốc với một vết nứt đường C3'-endo "cố định".

Hợp chất nucleic nucleic mới dạng BNA có thể được tổng hợp và kết hợp thành oligonucleotit. Khi so sánh với thể hệ trước của XNA như PNA hoặc LNA, BNA có những ưu thế như i) gắn kết bền vững hơn với các phân tử ARN hoặc ADN có trình tự bổ sung, ii) tính chọn lọc cao ở mức từng nucleotit đơn lẻ; kháng lại sự tấn công của nucleaza đặc biệt là endo và exo-nucleaza.

Theo đó, để tăng cường mức độ phát hiện đột biến gen TERT giúp hỗ trợ trong việc chẩn đoán bệnh ung thư không xâm lấn, các tác giả sử dụng các đoạn peptit kẹp phân tử có trình tự tối ưu cho bắt cặp bổ sung với trình tự gen TERT thể đại trong quá trình PCR, sự có mặt của các peptit kẹp phân tử phù hợp sẽ “kẹp” và ức chế sự nhân lên của các phân tử thể đại, nhờ đó PCR sẽ tập trung khuếch đại và làm giàu thể đột biến, từ đó tăng được mức phát hiện đột biến. Sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến gen TERT, các đoạn mồi đặc hiệu, các đoạn peptit kẹp phân tử và các đầu dò phân tử dùng trong phương pháp này.

Quy trình theo sáng chế nhằm phát hiện các đột biến gen TERT có mã trên ngân hàng gen với mã truy cập NG_009265 tại các vị trí G124 và G146. Trong đó G124 và G146 này có thể bị thay thế bởi T, C hoặc A một cách độc lập. Các tác giả sử dụng các

cặp mỗi khác nhau để khuếch đại đặc hiệu khoảng từ 150 đến 500 nucleotit xung quanh vị trí G124 và G146 của gen TERT có số truy cập trong ngân hàng gen NG_009265.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến gen TERT để chẩn đoán bệnh ung thư không xâm lấn, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) thu ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm; b) khuếch đại gen TERT bằng PCR đa mỗi bất đối xứng; c) tinh sạch sản phẩm PCR; và d) phát hiện đột biến trên gen TERT.

Trong bước thu ADN tổng số, ADN từ mẫu bệnh phẩm được chiết bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số cho bệnh phẩm mô tươi hoặc sử dụng xelen, hoặc bằng kit dùng riêng cho mẫu bệnh phẩm vùi trong khối nền theo quy trình chuẩn. Các kỹ thuật này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực lý thuật này.

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

Mỗi xuôi là một trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.2 và SEQ ID NO.3 sau:

GGC CGA TTC GAC CTC TCT (SEQ ID NO.1)

GTCCTGCCCCTTCACCTT (SEQ ID NO.2)

GTCCTGCCCCTTCACCTT (SEQ ID NO.3)

Mỗi ngược là một trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5 sau:

CAGCGCTGCCTGAAACTC (SEQ ID NO.4)

AGC ACC TCG CGG TAG TGG (SEQ ID NO.5)

Peptit kẹp phân tử (xeno nucleic acid: XNA) là một trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm peptit axit nucleic (peptit nucleic acid: PNA), peptit khóa phân tử (LNA) và axit nucleic cầu nối (bridged nucleic acid: BNA), trong đó:

Peptit axit nucleic (peptit nucleic acid: PNA) có trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.6, SEQ ID. NO.7 và SEQ ID NO.8 sau:

NH₂-CCCGGAGGGGG -CONH₂ (SEQ ID NO.6)

NH₂- GGCCCGGAGGGGGCTGG -CONH₂ (SEQ ID NO.7)

NH₂- CCGGAGGGGGCT-CONH₂ (SEQ ID NO.8)

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 sử dụng theo sáng chế 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). Do việc bắt cặp với những dạng lai hóa LNA/ADN hoặc LNA/ARN này rất bền với nhiệt nên chúng sẽ ức chế đặc hiệu sự nhân lên của các đoạn không đột biến. 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.

Peptit khóa phân tử (locked nucleic acid: LNA) là một trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.9, SEQ ID. NO.10 và SEQ ID NO.11:

ccggaG'ggggct (SEQ ID NO.9)

gcccggaG'ggggctg (SEQ ID NO.10)

ggcccggaG'ggggctgg (SEQ ID NO.11)

Trong đó, peptit khóa phân tử này có các vị trí G' là guamin cải biến, nghĩa là các đồng phân của guamin có liên kết 2'-O,4'-C-methylene-beta-D-ribofuranosyl.

Axit nucleic dạng cầu nối (bridged nucleic acid: BNA) dùng làm kẹp phân tử là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm:

ccctC"ccgggtccccggcccagccccC"tccg (SEQ ID NO.12)

ccctC"ccgggtccccggcccagccccC"tccgg (SEQ ID NO.13)

gaccctC"ccgggtccccggcccagccccC"tccgggacct (SEQ ID NO.14)

Axit nucleic cầu nối (bridged nucleic acid: BNA) là các axit ribonucleic C" đã được sửa đổi với các vị trí C" là vết nứt đường C3'-endo "cố định". Cấu trúc này được kết hợp tổng hợp ở vị trí 2' và 4' của riboza để tạo ra monomer 2', 4'-BNA.

Trong bước tinh sạch sản phẩm PCR, bổ sung 250ml 10mM tris-HCl, pH=8,8 và 0,4 ml dung dịch phenol, cloroform isoamylalcohol 25:24:1 vào sản phẩm PCR, sau đó ly tâm trong 20 phút thu dịch nổi, rồi bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 0,7/1 (v/v) và ly tâm tiếp trong 30 phút thu kết tủa rồi rửa sạch bằng cồn 75% thu được sản phẩm PCR tinh sạch.

Trong bước phát hiện đột biến gen, tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR tinh sạch thu được ở trên, sau đó dựa trên kết quả phát hiện đột biến tại vị trí G124 và/hoặc G146 để đưa ra kết luận về mức độ đột biến gen TERT.

Trong trường hợp không sử dụng đoạn kẹp XNA, phản ứng PCR hoặc PCR định lượng có sử dụng cặp mồi đặc hiệu: với mồi xuôi là một trong các trình tự SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3 và mồi ngược là một trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5 sẽ khuếch đại gen TERT. Sản phẩm khuếch đại bất kể có hay không có đột biến tại vị trí G124 và G146. Khi đó, nếu sử dụng các chất nhuộm ADN phát huỳnh quang không đặc hiệu như Sybrgreen, Cyto-9, Cyto-13, Cyto-17, Cyto-60, Cyto-16, Cyto-64, tín hiệu thu được không đặc hiệu cho sản phẩm khuếch đại từ thể đại hay thể đột biến, và nếu sử dụng phương pháp giải trình tự Sanger thông thường sẽ không thể phát hiện được các thể đột biến nếu tỷ lệ đột biến trong mẫu dưới mức 25%. Để giải quyết vấn đề trên, các tác giả đã sử dụng các XNA có kích thước từ 11-25 gốc bắt cặp đặc hiệu với trình tự thể đại của gen TERT có số truy cập NG_009265. Các đoạn XNA này có thể là một trong các chuỗi SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.14. Các chuỗi này có tính chất bắt cặp rất đặc hiệu với các trình tự axit nucleic bổ sung hình thành các lai ghép XNA/ADN bền vững, với nhiệt độ tan chảy cao hơn rất nhiều nhiệt độ tan chảy của lai ghép ADN/ADN hoặc ADN/ARN (khoảng 15°C/chuỗi), mặt khác nếu có sự khác biệt về trình tự giữa chuỗi XNAs và phân tử ADN (chuyển ADN đột biến), tính ổn định của lai ghép các XNA/ADN suy giảm rất mạnh làm giảm nhiệt độ tan chảy của các lai ghép này. Điều này có nghĩa khi sử dụng các XNA trong các phản ứng PCR, chúng bắt cặp đặc hiệu với các trình tự ADN trình tự thể đại, kẹp chặt các đoạn ADN thể đại và ngăn ngừa sự hình thành liên kết phosphodiester kéo dài từ các chuỗi mồi (primer elongation), hay nói cách khác, phản ứng khuếch đại các phân tử ADN thể đại mang trình tự bắt cặp bổ sung với các chuỗi XNA (SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.14) sẽ bị ức chế, chỉ các đoạn gen có trình tự khác biệt với các chuỗi XNA (nghĩa là trình tự đột biến) sẽ được nhân lên và cho phép phát hiện được bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger truyền thống.

Theo đó, bằng cách bổ sung các peptit kẹp phân tử, các thể không đột biến bị ức chế trợ giúp cho việc nhân lên các thể đột biến, tiếp đó, bằng phương pháp giải trình tự, giúp phát hiện được các đột biến đã được nhân lên bởi PCR đặc hiệu. Điều này giúp tăng mức ngưỡng phát hiện gen TERT đột biến, từ đó đưa ra chẩn đoán sớm bệnh ung thư.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến các đoạn mỗi dùng trong phương pháp theo sáng chế, trong đó:

Mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 sau:

GGCCGATTCGACCTC TCT (SEQ ID NO.1)

GTCCTGCCCCCTTCACCTT (SEQ ID NO.2)

GTCCTGCCCCCTTCACCTT (SEQ ID NO.3)

Mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5 sau:

CAGCGCTGCCTGAAACTC (SEQ ID NO.4)

AGC ACC TCG CGG TAG TGG (SEQ ID NO.5)

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến các đoạn peptit kẹp phân tử (peptit nucleic acid: PNA) dùng trong phương pháp theo sáng chế, trong đó peptit kẹp phân tử này là peptit axit nucleic có trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.6, SEQ ID. NO.7 và SEQ ID NO.8:

NH₂-CCCGGAGGGGG -CONH₂ (SEQ ID NO.6)

NH₂- GGCCCGGAGGGGGCTGG -CONH₂ (SEQ ID NO.7)

NH₂- CCGGAGGGGGCT-CONH₂ (SEQ ID NO.8)

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến các các đoạn peptit kẹp phân tử là dạng axit nucleic khóa phân tử (locked nucleic acid: LNA), trong đó axit nucleic khóa này là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10 và SEQ ID. NO.11 sau:

ccggaG'ggggct (SEQ ID NO.9)

gccccggaG'ggggctg (SEQ ID NO.10)

ggccccggaG'ggggctgg (SEQ ID NO.11)

Trong đó, peptit khóa phân tử này có các vị trí G' là guamin cải biến, nghĩa là các đồng phân của guamin có liên kết 2'-O,4'-C-methylene-beta-D-ribofuranosyl.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến các các đoạn peptit kẹp phân tử là dạng axit nucleic cầu nối (bridged nucleic acid: BNA), trong đó đoạn axit nucleic cầu nối này là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14.

ccctC"ccgggtccccggccccagccccC"tccg (SEQ ID NO.12)

ccctC"ccgggtccccggccccagccccC"tccgg (SEQ ID NO.13)

gaccctC"ccgggtccccggccagccccC"tccgggcct

(SEQ ID NO.14)

Axit nucleic cầu nối (bridged nucleic acid: BNA) là các axit ribonucleic đã được sửa đổi với các vị trí C" là vết nứt đường C3'-endo "cố định". Cấu trúc này được kết hợp tổng hợp ở vị trí 2' và 4' của riboza để tạo ra monomer 2', 4'-BNA.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ XNAs đến khả năng phát hiện đột biến gen TERT bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger

Tiến hành nuôi và thu hoạch tế bào HEG2 mang đột biến gen TERT dị hợp tử G124A (C228T) (điều này có nghĩa 50% bản sao của gen TERT sẽ mang đột biến G124A (C228T) và tế bào HT-29 không mang đột biến gen TERT ở các tỷ lệ 0%, 1%, 10%, 25% hoặc 50% tế bào HEG2 và tiến hành tách ADN tổng số, khi đó tỷ lệ ADN mang đột biến gen TERT từ các mẫu tách tương ứng cũng sẽ là 0%, 1%, 10%, 25% hoặc 50%.

Tiến hành chuẩn độ các mẫu và pha loãng đến nồng độ 25ng/ul.

Tiến hành chạy phản ứng PCR với thành phần bao gồm: 5 µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2 µM mỗi xuôi, 0,2 µM mỗi ngược, 3 pM/µl XNA kẹp phân tử tương ứng và nước vừa đủ thể tích 25µl.

Cặp mỗi sử dụng là trình tự được nêu trong SEQ ID NO.2 và mỗi ngược là trình tự được nêu trong SEQ ID NO.4, phân tử XNA là trình tự được nêu trong SEQ ID No.8

Tinh sạch sản phẩm PCR: bổ sung 250ml 10mM tris-HCl, pH=8,8 và 0,4 ml dung dịch phenol, cloroform isoamylalcohol 25:24:1 rồi ly tâm trong 20 phút thu dịch nổi, sau khi bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 0,7/1 (v/v) và ly tâm tiếp trong 30 phút thu kết tủa rồi rửa sạch bằng cồn 75% thu được ADN sản phẩm tinh sạch sau PCR.

Giải trình tự sản phẩm PCR phát hiện đột biến: sử dụng 10 ng sản phẩm PCR, mỗi xuôi là trình tự SEQ ID NO.2 5 pmoles (1 uL x 5 uM) và 8,0 µL DTCS Quick Start Master Mix (áp dụng cho máy giải trình tự CEQ_8000); Điều chỉnh nước cất đến thể tích 20ul. Kết quả thể hiện trên Hình 1.

Kết quả thử nghiệm này cho thấy, khi không có mặt XNA trong phản ứng PCR khuếch đại gen TERT, thì bước giải trình tự bằng kỹ thuật Sanger không thể phát hiện được tín hiệu đột biến ở các mẫu có tỷ lệ độ biến 1%, 10% hoặc 25%.

Tuy nhiên, khi bổ sung XNA ở nồng độ 3pM vào phản ứng PCR khuếch đại, Khi

giải trình tự ở bước sau sẽ phát hiện được đột biến gen TERT C228T ở các tỷ lệ đột biến 1%, 10% hoặc 25%.

Ví dụ 2: Xác định ngưỡng tối thiểu XNA cần thiết cho phát hiện đột biến gen TERT trên bệnh phẩm bệnh nhân ung thư

Các mẫu tế bào HEG2 mang đột biến gen TERT ở các tỷ lệ 0%, 1%, 5% hoặc 50% được chuẩn đến nồng độ 25ng/ul.

Tiến hành chạy phản ứng PCR với thành phần bao gồm: 5 µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2 µM mỗi xuôi, 0,2 µM mỗi ngược, 3 pM/µl XNA kẹp phân tử tương ứng và nước vừa đủ thể tích 25µl.

Cặp mồi sử dụng là trình tự được nêu trong SEQ ID NO.2 và mồi ngược là trình tự được nêu trong SEQ ID NO.4, phân tử XNA là trình tự được nêu trong SEQ ID No.8

Tinh sạch sản phẩm PCR: bổ sung 250ml 10mM tris-HCl, pH=8,8 và 0,4 ml dung dịch phenol, cloroform isoamylalcohol 25:24:1 rồi ly tâm trong 20 phút thu dịch nổi, sau khi bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 0,7/1 (v/v) và ly tâm tiếp trong 30 phút thu kết tủa rồi rửa sạch bằng cồn 75% thu được ADN sản phẩm tinh sạch sau PCR.

Giải trình tự sản phẩm PCR phát hiện đột biến: sử dụng 10 ng sản phẩm PCR, mồi xuôi là trình tự SEQ ID NO.2 5 pmoles (1 uL x 5 uM) và 8.0 µL DTCS Quick Start Master Mix (áp dụng cho máy giải trình tự CEQ_8000); Điều chỉnh nước cất đến thể tích 20ul. Kết quả thể hiện trên Hình 2.

Kết quả thử nghiệm trên Hình 2 cho thấy, khi không có mặt XNA trong phản ứng PCR khuếch đại gen TERT, thì bước giải trình tự bằng kỹ thuật Sanger không thể phát hiện được tín hiệu đột biến ở các mẫu có tỷ lệ đột biến 1% hoặc 5%.

Tuy nhiên, khi bổ sung XNA ở nồng độ 1,5 hoặc 1,5 pM vào phản ứng PCR, thì ở bước sau sẽ phát hiện được đột biến gen TERT C228T ở các tỷ lệ đột biến 1% hoặc 5%.

Từ đó có thể kết luận việc bổ sung XNA vào phản ứng PCR cho phép giải trình tự bằng phương pháp Sanger thì phát hiện được đột biến ở mức 1%, cao hơn rất nhiều mức 25% của phương pháp giải trình tự truyền thống.

Ví dụ 3: Sàng lọc đột biến gen TERT bằng phương pháp PCR làm giàu thể đột biến bất đối xứng trên bệnh phẩm

Để đánh giá ảnh hưởng của XNA trong phát hiện đột biến gen TERT trên bệnh phẩm bệnh nhân ung thư, nhóm tác giả đã tiến hành thu nhận 32 bệnh phẩm khác nhau

32 bệnh nhân ung thư nguyên phát tế bào gan, nước tiểu bệnh nhân u bàng quang.

Kết quả phân tích định lượng đột biến gen TERT sử dụng cặp mồi có SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.4 có hoặc không sử dụng XNA kẹp có trình tự SEQ ID NO.6 với nồng độ 1,5 pmole/ul với ngưỡng phát hiện 1%. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Tổng kết kết quả sàng lọc định lượng đột biến gen TERT

Bệnh phẩm	Kết quả		Bệnh phẩm	Kết quả	
	Không XNA	Có XNA		Không XNA	Có XNA
C1	âm tính	âm tính	C17	dương tính	dương tính
C2	âm tính	âm tính	C18	âm tính	âm tính
C3	âm tính	âm tính	C19	âm tính	âm tính
C4	âm tính	âm tính	C20	âm tính	âm tính
C5	âm tính	âm tính	C21	âm tính	âm tính
C6	dương tính	dương tính	C22	âm tính	âm tính
C7	âm tính	âm tính	C23	âm tính	âm tính
C8	dương tính	dương tính	C24	âm tính	âm tính
C9	âm tính	âm tính	C25	âm tính	âm tính
C10	âm tính	âm tính	C26	âm tính	âm tính
C11	âm tính	âm tính	C27	âm tính	âm tính
C12	dương tính	dương tính	C28	âm tính	âm tính
C13	âm tính	dương tính	C29	dương tính	>20
C14	âm tính	âm tính	C30	dương tính	dương tính
C15	âm tính	âm tính	C31	âm tính	âm tính
C16	âm tính	dương tính	C32	dương tính	dương tính
C16	âm tính	âm tính	C32	âm tính	âm tính
C16	âm tính	dương tính	C32	âm tính	âm tính
C16	âm tính	âm tính	C32	âm tính	âm tính
C16	dương tính	dương tính	C32	âm tính	âm tính
C16	âm tính	âm tính	C32	âm tính	dương tính
C16	dương tính	dương tính	C32	âm tính	âm tính
C16	âm tính	âm tính	C32	âm tính	âm tính
C16	âm tính	dương tính	C32	âm tính	âm tính
C16	dương tính	dương tính	C32	dương tính	âm tính

Kết quả bảng 01 cho thấy:

Khi không sử dụng XNA, phương pháp giải trình tự thông thường chỉ phát hiện được 9/32 (28,2%) bệnh phẩm mang đột biến gen TERT. Tuy nhiên khi sử dụng XNA, như mô tả ở trên, phương pháp theo sáng chế phát hiện được 14/32 (43,8%) bệnh phẩm

mang đột biến gen TERT.

Tất cả các trường hợp dương tính do phát hiện bằng phương pháp giải trình tự truyền thống đều được tương đồng với kết quả chẩn đoán bằng phương pháp theo sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Bằng cách sử dụng đoạn môi đặc hiệu và XNA dạng kẹp peptit hoặc khóa axit nucleic (LNA), các tác giả đã phát triển được quy trình phát hiện đột biến gen TERT dựa trên kỹ thuật phân tử để chẩn đoán bệnh ung theo sáng chế cho phép phát hiện các đột biến tại của cả 02 kiểu đột biến G124 và/hoặc G146 với mức độ đột biến đạt 1% trên tổng lượng ADN trong mẫu bệnh phẩm, hỗ trợ hiệu quả cho chẩn đoán các bệnh lý ung thư mà ở đó đột biến gen TERT được ghi nhận có tần suất xuất hiện cao như ung nguyên phát tế bào gan, ung thư mô đệm thần kinh, ung thư tuyến giáp, ung thư da và ung thư bàng quang dựa trên cơ sở phát hiện đột biến gen TERT từ máu ngoại vi, nước tiểu hoặc dịch não tủy một cách nhanh chóng, hữu hiệu và tin cậy.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện đột biến gen TERT tại vị trí G124 và/hoặc G146, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp phenol/chloroform hoặc bằng kit tách ADN tổng số cho bệnh phẩm mô tươi hoặc sử dụng xelen, hoặc bằng kit dùng riêng cho mẫu bệnh phẩm vùi trong khối nên theo quy trình chuẩn;

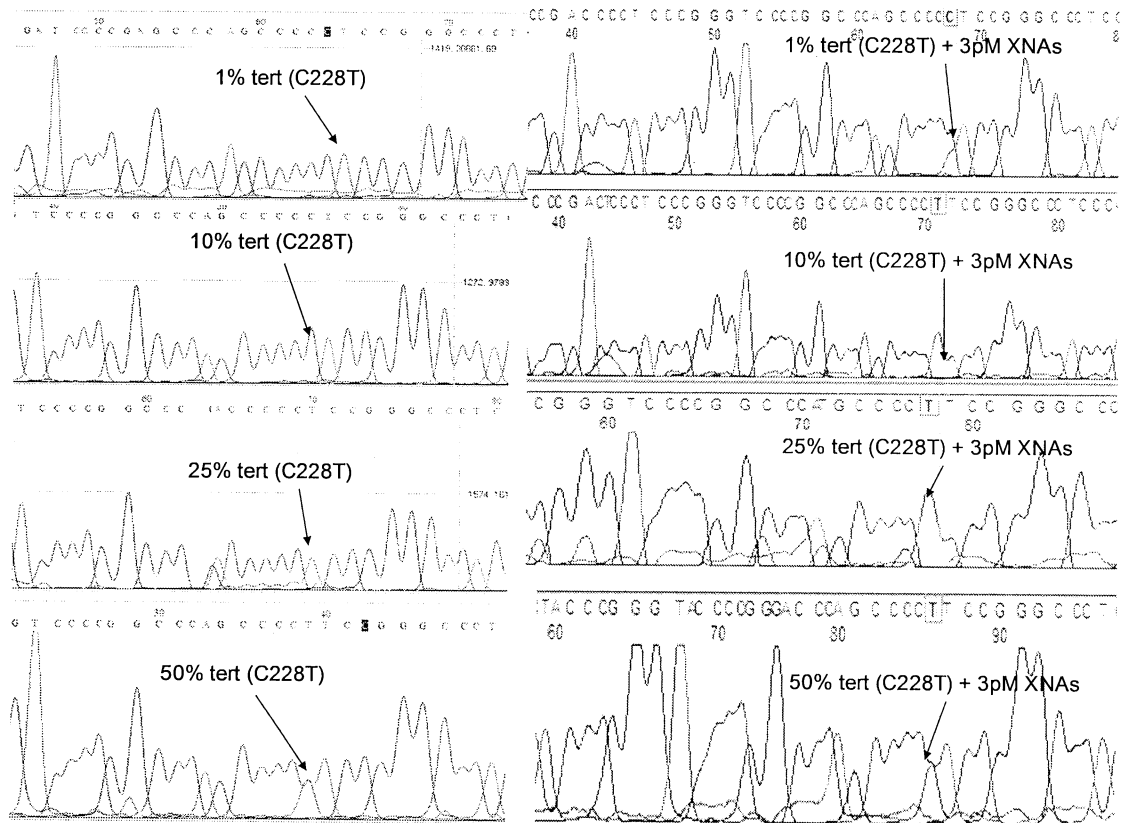
b) khuếch đại gen bằng PCR đa mồi bất đối xứng với thành phần phản ứng bao gồm: 5 µl ADN tổng số, 10mM tris-HCl, pH=8,8, 50mM KCl, 0,1% Triton x-10, 200 µM dNTP, 1 đơn vị Taq polymeraza, 0,2 µM mồi, từ 1,5 đến 5 pM/µl peptit kẹp phân tử, đầu dò và nước vừa đủ thể tích 25µl, trong đó:

- mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID. NO.2 hoặc SEQ ID NO.3;
- mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.5;
- peptit kẹp phân tử là trình tự bất kỳ được lựa chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.6, SEQ ID. NO.7; SEQ ID NO.8 SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID. NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14;

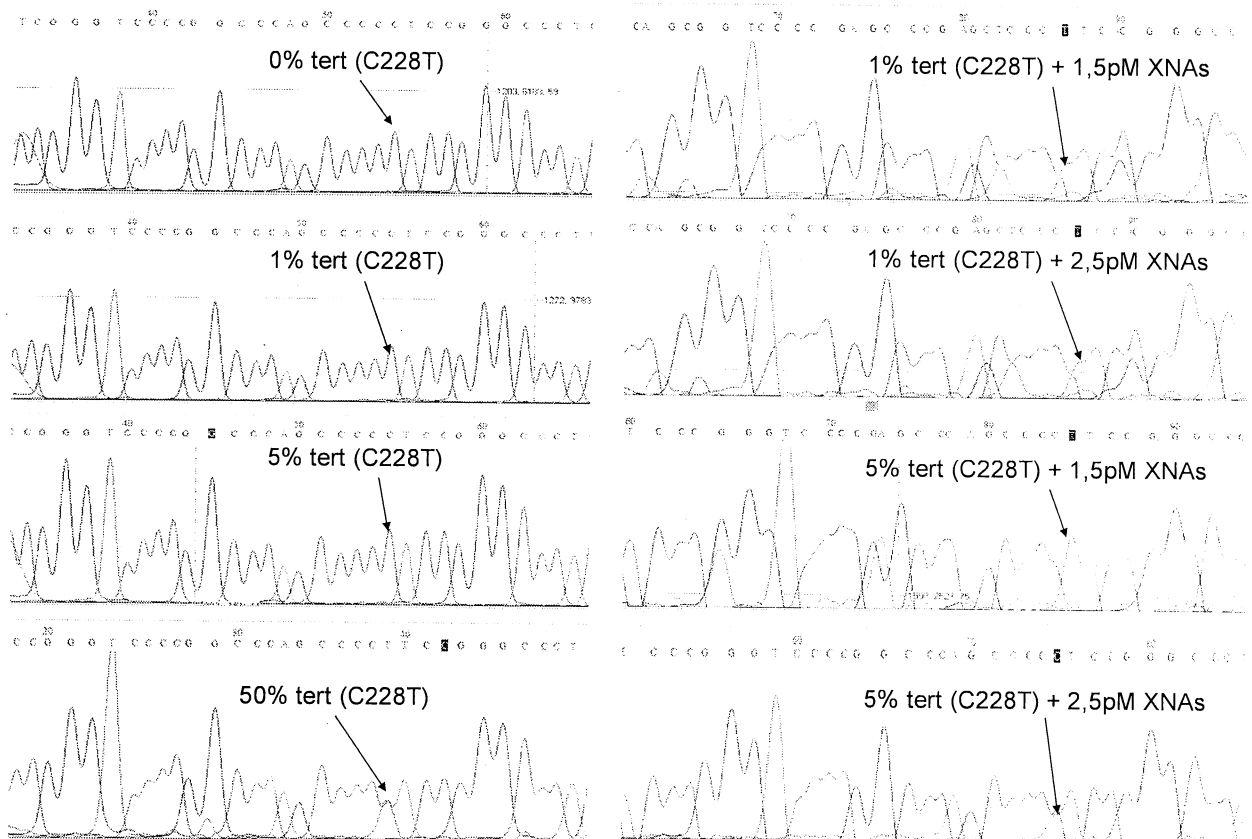
c) tinh sạch sản phẩm PCR bằng cách bổ sung 250ml 10mM tris-HCl, pH=8,8 và 0,4 ml dung dịch phenol, cloroform isoamylalcohol 25:24:1 rồi ly tâm trong 20 phút thu dịch nổi, sau đó bổ sung isopropanol theo tỷ lệ 0,7/1 (v/v) và ly tâm tiếp trong 30 phút thu kết tủa rồi rửa sạch bằng cồn 75% thu được sản phẩm PCR tinh sạch; và

d) phát hiện đột biến gen bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR tinh sạch thu được từ bước c) dựa trên kết quả phát hiện đột biến gen tại vị trí G124 và/hoặc G146 để đưa ra kết luận về mức độ đột biến gen TERT.

HÌNH 1



HÌNH 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Bệnh viện Trung ương quân đội 108
<120> Quy trình phát hiện đột biến gen TERT
<130>
<160> 14
<170>

<210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 1
GGCCGATTCGACCTCTCT

<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 2
GTCCTGCCCCTTCACCTT

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 3
GTCCTGCCCCTTCACCTT

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 4

CAGCGCTGCCTGAAACTC

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<220>

<400> 5

AGCACCTCGCGGTAGTGG

<210> 6

<211> 11

<212> ADN peptit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kẹp phân tử

<220>

<400> 6

NH2-CCCGGAGGGGG-CONH2

<210> 7

<211> 17

<212> ADN peptit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kẹp phân tử

<220>

<400> 7

NH2-GGCCCGGAGGGGGCTGG-CONH2

<210> 8

<211> 12

<212> ADN peptit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kẹp phân tử

<220>

<400> 8

NH2-CCGGAGGGGGCT-CONH2

<210> 9

<211> 12

<212> axit nucleic khóa
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kẹp phân tử

<220>
 <400> 9
 ccgga**G**ggggct

<210> 10
 <211> 15
 <212> axit nucleic khóa
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kẹp phân tử

<220>
 <400> 10
 gcccgga**G**ggggctg

<210> 11
 <211> 17
 <212> axit nucleic khóa
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kẹp phân tử

<220>
 <400> 11
 ggcccgga**G'**ggggctgg

<210> 12
 <211> 34
 <212> axit nucleic cầu nối
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kẹp phân tử

<220>
 <400> 12
 cccct**C''**ccgggtccccggcccagcccc**C''**tccg

<210> 13
 <211> 32
 <212> axit nucleic cầu nối
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> kẹp phân tử

<220>

<400> 13

ccct**C**"ccgggtccccggcccagcccc**C**"tccgg

<210> 14

<211> 40

<212> axit nucleic cầu nối

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kẹp phân tử

<220>

<400> 14

gacccct**C**"ccgggtccccggcccagcccc**C**"tccgggccct