



(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) 
1-0021449

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **B**

(21) 1-2018-03041

(22) 04.08.2015

(62) 1-2015-02824

(30) 1-2015-02824 04.08.2015 VN

(45) 26.08.2019 377

(43) 25.09.2018 366

(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)

(54) **QUY TRÌNH PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN EGFR**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen EGFR có mã NM_005228.3 tại vị trí exon 20 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng; và) phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR. Bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu, đầu dò phân tử và kẹp peptit, quy trình theo sáng chế cho phép phát hiện được đột biến liên quan đến exon 20 của gen EGFR với ngưỡng phát hiện đạt 0,1% nhằm hỗ trợ trong việc đưa ra phác đồ điều trị bệnh ung thư phổi.

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 gen EGFR tại các vị trí exon 18, 19, 20 và 21 của gen EGFR (bank accession number NM_005228.3) trên cơ sở PCR định lượng (realtime-PCR).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một đặc điểm nổi bật của ung thư phổi không tế bào nhỏ là sự gia tăng mức độ biểu hiện của thụ thể biểu mô (epithelial growth factor receptor-EGFR), thụ thể này mang hoạt tính tyrosin kinaza, mà hoạt lực của enzym này lại phụ thuộc nhiều vào tương tác giữa EGFR với các phân tử ATP tự do trong bào tương. Một khi EGFR thu nhận được ATP, nó sẽ chuyển sang trạng thái bị kích hoạt và truyền tín hiệu sống sót tới nhân bào, hỗ trợ cho quá trình tăng sinh của tế bào đồng thời tăng khả năng di căn của tế bào ung thư tới các mô lân cận.

Hiện nay trên thị trường được phẩm đã có một số dược chất có khả năng ức chế EGFR mà đã được cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho phép sử dụng để điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn muộn là Gefitinib và Erlotinib, và gần đây là Afatinib. Việc chỉ định sử dụng các dược phẩm này không chỉ phụ thuộc vào mức độ biểu hiện của thụ thể EGFR, mà bản thân trạng thái đột biến của gen EGFR cũng đóng vai trò quyết định sự thành công của các phác đồ điều trị đích sử dụng các chất ức chế tyrosin kinaza. Điều này đã được khẳng định trong bản đồng thuận của hội ung thư lâm sàng châu Âu (EMSO) và mạng lưới ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCCN), theo đó xét nghiệm phát hiện trạng thái đột biến gen EGFR là bắt buộc trước khi cân nhắc chỉ định TKI cho bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (Azzoli, Baker et al. 2010, Crino, Weder et al. 2010, D'Addario, Früh et al. 2010, Keedy, Temin et al. 2011).

Các cộng đồng dân cư khác nhau có tần suất xuất hiện các đột biến EGFR khác nhau: trong khi chỉ có 10-15% bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ là người châu Âu, châu Phi (Caucasian ethnics) mang đột biến EGFR, nhưng tỷ lệ này ở người châu Á là khoảng từ 40 đến 60% (Takano, Fukui et al. 2008, Mole, Wu et al. 2009). Đa số các trường hợp đột biến gen EGFR xảy ra ở các exon 18 (3%), exon 19 (45-53%), exon 20 (4%) và exon 21 (45%) (Maemondo, Inoue et al. 2010). Các vị trí đột biến tại

các exon khác nhau quyết định các tính chất sinh hóa khác nhau của EGFR, đồng thời quyết định khả năng đáp ứng điều trị khác nhau của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ đối với chất ức chế tyrosin kinaza (TKI): Bệnh nhân bị ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn muộn (IIIb hoặc IV) sẽ có khả năng đáp ứng điều trị tốt với phác đồ điều trị đích sử dụng Gefitinib hoặc Erlotinib nếu đột biến EGFR xảy ra tại exon 19 (đột biến mất đoạn delE746-A750) hoặc đột biến điểm L858R diễn ra trên exon 21, thời gian sống kéo dài trung bình đối với những bệnh nhân mang các đột biến này là khoảng 16,5 tháng (Sharma, Bell et al. 2007). Ngược lại, nếu bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ mang đột biến tại exon 20 (T790M) thì đáp ứng rất kém thậm chí kháng lại TKI và thời gian sống kéo dài của các bệnh nhân này chỉ khoảng 7,7 tháng (Maheswaran, Sequist et al. 2008).

Khi tiến hành so sánh hiệu quả điều trị giữa phác đồ hóa trị liệu truyền thống sử dụng carboplatin- paclitaxel và phác đồ điều trị đích sử dụng Gefitinib hoặc Erlotinib người ta thấy rằng thời gian sống không bệnh (disease free survival) và thời gian sống trung bình của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn IIIb hoặc IV được điều trị bằng carboplatin-paclitaxel tương ứng là 5,4 tháng và 23,6 tháng, trong khi đó ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ mang đột biến mất đoạn exon 19 hoặc đột biến điểm exon 21 là 10,8 và 30,5 tháng (Caicun Zhou, 2010, Maemondo, Inoue et al. 2010). Các nghiên cứu cũng cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ sử dụng carboplatin-paclitaxel trong phác đồ hóa trị liệu với các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ không mang đột biến EGFR theo phác đồ điều trị đích sử dụng Gefitinib (Takano, Fukui et al. 2008).

Chính vì sự đa dạng về đột biến của gen EGFR và tác động của nó tới đáp ứng điều trị bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ với dược phẩm ức chế EGFR tyrosin kinaza mà các văn bản đồng thuận mới nhất về thực hành lâm sàng hướng dẫn điều trị bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ do Hiệp hội ung thư lâm sàng Mỹ (American society of clinical oncology) và Hiệp hội ung thư lâm sàng châu Âu (European society for clinical oncology) (Azzoli, Baker et al. 2010, Crino, Weder et al. 2010, D'Addario, Fruh et al. 2010, Keedy, Temin et al. 2011) đã khuyến cáo chỉ định xét nghiệm trạng thái đột biến của các exon 18, 19, 20 và 21 của gen EGFR trước khi đưa ra quyết định lựa chọn liệu pháp điều trị hướng đích sử dụng chất ức chế EGFR

tyrosin kinaza hay hóa trị liệu (chemotherapy) có sử dụng carboplatin-paclitaxel.

Đột biến bệnh sinh ung thư ví dụ như đột biến gen EGFR, KRAS, PIK3CA (trong ung thư phổi, ung thư đại trực tràng) hoặc FLT3, NPM1, v.v. trong ung thư máu chỉ xảy ra ở tế bào ác tính, nó không tồn tại ở tế bào khỏe mạnh. Trong khi đó các phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm không thể đảm bảo toàn bộ bệnh phẩm là các tế bào ác tính. Hơn nữa không phải tất cả tế bào ác tính đều mang đột biến. Chính vì thế phương pháp phát hiện đột biến phải đủ nhạy để đảm bảo phát hiện được đột biến ngay cả khi nó xuất hiện ở mức thấp trong mẫu bệnh phẩm, thậm chí có trong ngay trong máu ngoại vi.

Tuy nhiên, hiện các hiệp hội ung thư quốc tế như Hội ung thư lâm sàng châu Âu (European society for Medical Oncology), Hội ung thư Hoa Kỳ (American Society of Clinical Oncology) và bản thân các cơ quan bảo hiểm cũng như Bộ Y tế Việt Nam chưa quy định phương pháp chuẩn để phát hiện các đột biến bệnh sinh ung thư. Chính vì thế nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đưa ra các phương pháp phát hiện đột biến cũng như các quy trình thu gom bệnh phẩm khác nhau. Chúng có độ nhạy kỹ thuật và giá thành khác nhau.

Phương pháp giải trình tự gen trực tiếp (Sanger sequencing) là phương pháp rẻ tiền nhất, dễ triển khai nhất, nhưng độ nhạy kỹ thuật thấp nhất (chỉ có thể phát hiện đột biến khi lượng tế bào đột biến trên 20% tổng số tế bào. Thông thường để đảm bảo có đủ lượng tế bào ác tính, các phòng thí nghiệm triển khai giải trình tự gen cần sự trợ giúp từ các nhà giải phẫu bệnh khoanh vùng khu vực bệnh phẩm có tế bào ác tính trước khi tiến hành tách ADN cho mục đích phát hiện đột biến. Mặc dù là phương pháp có độ nhạy kỹ thuật rất thấp, có độ âm tính giả cao, nhưng do thiết bị và hóa chất đắt tiền nên giá thành xét nghiệm phát hiện đột biến EGFR bằng phương pháp này cũng không rẻ, khoảng 5 triệu/bệnh nhân/lần xét nghiệm.

Nhóm phương pháp realtime PCR dựa trên đầu dò phân tử taqman probe. Trong trường hợp đầu Taqman được thiết kế tích hợp công nghệ ARMS (amplification refractory mutation system) thì độ nhạy kỹ thuật khá cao (có thể phát hiện được đột biến khi tế bào ác tính mang đột biến ở mức trên 1%), vì thế không cần các nhà giải phẫu bệnh, khoanh vùng các khu vực có tế bào ác tính và thậm chí có thể áp dụng phát hiện đột biến EGFR từ ADN lưu hành tự do trong máu ngoại vi (thay vì phải sinh thiết

khối u, làm mô bệnh học).

Tuy nhiên, do tính chất đột biến gen EGFR rất đa dạng - có khoảng trên 50 biến thể đột biến gen EGFR đã được mô tả, do đó nếu đơn thuần áp dụng nhóm các phương pháp realtime PCR dựa trên đầu dò phân tử taqman probe hoặc PCR với các cặp mồi đặc hiệu alen, thì cần nhiều đầu dò phân tử hoặc cặp mồi (có thể trên 50 đầu dò phân tử) và trên 100 cặp mồi đặc hiệu alen, khi đó chi phí xét nghiệm sẽ rất lớn.

Do đó, cần có một phương pháp có khả năng phát hiện được đột biến sinh bệnh trên gen EGFR đủ nhạy với lượng các đầu dò giảm, để có thể giảm được số lượng các lần xét nghiệm, nhưng vẫn đảm bảo mức độ sàng lọc đột biến sinh bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, mặc dù có một sự đa dạng trong đột biến trên gen EGFR, nhưng chỉ cần phát hiện được một trong các exon 18, 19, 20 hoặc 21 có mang đột biến hay không là đủ để đánh giá bệnh ung thư phổi. Theo đó, sáng chế đề xuất quy trình phát hiện đột biến gen EGFR mã NM_005228.3 tại các vị trí exon được chọn từ nhóm bao gồm 18, 19, 20 và 21 từ các mẫu ADN tổng số được tách từ bệnh phẩm của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) Khuếch đại gen EGFR bằng PCR trên máy PCR định lượng; và
- b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

Quy trình theo sáng chế sử dụng kỹ thuật realtime PCR với các mồi đặc hiệu cho các vị trí exon 18, exon 19, exon 20 hoặc exon 21 và các đoạn kẹp phân tử dạng axit nucleic peptit có khả năng ức chế sự khuếch đại các đoạn ADN gen thể đại, nhưng lại tạo điều kiện cho việc nhân lên các phân tử ADN gen EGFR thể đột biến để tăng cường mức độ phát hiện đột biến.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Mô tả cơ sở lý thuyết của phương pháp PCR kẹp nucleic peptit.

Hình 2: Là phổ ghi tín hiệu huỳnh quang phát hiện đột biến E746-A750del ở các tỷ lệ biết trước.

Hình 3: Là phổ ghi tín hiệu huỳnh quang phát hiện đột biến 21 L858R ở các tỷ lệ đã biết.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ axit nucleic peptit (Peptide nucleic acid - PNA) là một dạng polyme nhân tạo đồng đẳng với các chuỗi axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (RNA), cấu trúc dạng đồng đẳng này được tạo ra bởi Peter E. Nielsen (Trường đại học Copenhagen) (Nielsen, Egholm et al. 1991).

ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm dùng trong quy trình theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp tách chiết ADN tổng số đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phenol/cloroform hoặc kit tách ADN tổng số cho bệnh phẩm mô tươi hoặc sử dụng xylen, hoặc các kit dùng riêng cho mẫu bệnh phẩm vùi trong khối nền.

Theo đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen EGFR có mã NM 005228.3 tại vị trí exon 18 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng 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 và nước vừa đủ thể tích 25 µl, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 50°C trong 15 phút; 95°C trong 15 phút; (95°C trong 15 giây; 60 - 65°C trong 1 phút có ghi phổ huỳnh quang) X 50-55 chu kỳ; trong đó khác biệt ở chỗ:

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

- Mỗi ngược là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6;

- Kẹp peptit phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.51, SEQ ID NO.52, SEQ ID NO.53 và SEQ ID NO.54;

- Đầu dò phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28 và SEQ ID NO.29; và

b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

Quy trình theo sáng chế dùng để phát hiện các đột biến gen EGFR có mã trên ngân hàng gen với mã (bank accession number NM 005228.3) tại vị trí exon 18

(G719C, G719S, G719A, V689M, N700D, E709K/Q, S720P) như đã được mô tả bởi Sreenath V. Sharma và cộng sự (Sharma, Bell et al. 2007).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen EGFR có mã NM 005228.3 tại vị trí exon 19 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng 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 và nước vừa đủ thể tích 25 µl, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 50°C trong 15 phút; 95°C trong 15 phút; (95°C trong 15 giây; 60 - 65°C trong 1 phút có ghi phổ huỳnh quang) X 50-55 chu kỳ;

trong đó khác biệt ở chỗ:

- Mỗi xuôi là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8 và SEQ ID NO.9;

- Mỗi ngược là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12;

- Kẹp peptit phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56 và SEQ ID NO.57;

- Đầu dò phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.38, SEQ ID NO.39, SEQ ID NO.40, SEQ ID NO.41 và SEQ ID NO. 42; và

b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

Quy trình theo sáng chế dùng để phát hiện các đột biến gen EGFR có mã trên ngân hàng gen với mã (bank accession number NM 005228.3) tại vị trí exon 19 (ΔE746-A750, ΔE746-T751, ΔE746-A750 (ins RP), ΔE746-T751 (ins A/I), ΔE746-T751, (ins VA), ΔE746-S752 (ins A/V), ΔL747-E749 (A750P), ΔL747-A750 (ins P), ΔL747-T751, ΔL747-T751 (ins P/S), ΔL747-S752, ΔL747-752 (E746V), ΔL747-752, (P753S), ΔL747- S752 (ins Q), ΔL747-P753, ΔL747-P753 (ins S), ΔS752-I759) như đã được mô tả bởi Sreenath V. Sharma và cộng sự (Sharma, Bell et al. 2007).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen

EGFR có mã NM 005228.3 tại vị trí exon 20 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng 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 và nước vừa đủ thể tích 25 µl, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 50°C trong 15 phút; 95°C trong 15 phút; (95°C trong 15 giây; 60 - 65°C trong 1 phút có ghi phổ huỳnh quang) X 50-55 chu kỳ;

trong đó khác biệt ở chỗ:

- Mỗi xuôi là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 và SEQ ID NO.15;

- Mỗi ngược là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.18;

- Kẹp peptit phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 và SEQ ID NO.60;

- Đầu dò phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.44 và SEQ ID NO.45; và

b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

Quy trình theo sáng chế dùng để phát hiện các đột biến gen EGFR có mã trên ngân hàng gen với mã (bank accession number NM 005228.3) tại vị trí exon 20 (T790M (50%), D770_N771 (ins NPG), D770_N771 (ins SVQ), D770_N771 (ins G), N771T, V769L, S768I, V765A, T783A) như đã được mô tả bởi Sreenath V. Sharma và cộng sự (Sharma, Bell et al. 2007).

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến quy trình phát hiện đột biến gen EGFR có mã NM 005228.3 tại vị trí exon 21 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng 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 và nước vừa đủ thể tích 25 µl, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 50°C trong 15 phút; 95°C trong 15 phút; (95°C trong 15 giây; 60 - 65°C trong 1

phút có ghi phổ huỳnh quang) X 50-55 chu kỳ;

trong đó khác biệt ở chỗ:

- Mỗi xuôi là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 và SEQ ID NO.21;

- Mỗi ngược là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.24;

- Kẹp peptit phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.61, SEQ ID NO.62 và SEQ ID NO.63;

- Đầu dò phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49 và SEQ ID NO.50; và

b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

Quy trình theo sáng chế dùng để phát hiện các đột biến gen EGFR có mã trên ngân hàng gen với mã (bank accession number NM 005228.3) tại vị trí exon 21: (L858R (4(M5%), N826S, A839T, K846R, L861Q, G863D như đã được mô tả bởi Sreenath V. Sharma và cộng sự (Sharma, Bell et al. 2007).

Cơ sở lý thuyết của sáng chế này được trình bày trong hình 1: Các tác giả sử dụng các cặp mồi khác nhau (bảng 1) khuếch đại đặc hiệu 60-500 nucleotit xung quanh khu vực nghi ngờ có đột biến thuộc exon 18, 19, 20 hoặc 21 của gen EGFR có mã NM_005228.3 trong ngân hàng gen.

Phản ứng PCR hoặc realtime PCR có sử dụng các cặp mồi này sẽ đồng thời tạo ra các amplicon thể đại hoặc amplicon (đơn vị siêu sao chép) thể đột biến đặc trưng cho các exon 18, 19, 20 hoặc 21.

Để phát hiện các amplicon các tác giả có thể sử dụng sybrgreen hoặc ethidium bromit, hoặc các đầu dò phân tử (Taqman probe).

Một số các đầu dò phân tử có thể được dùng để phát hiện thể đột biến hoặc thể đại của các amplicon đặc hiệu cho exon 18, 19, 20, 21 được liệt kê ở bảng 2.

Tuy nhiên, nếu sử dụng các chất nhuộm không đặc hiệu cho trình tự ADN như sybrgreen hoặc ethidium bromit, cyto-9, v.v. sẽ không phân biệt được sự khác biệt giữa tín hiệu amplicon thể đại với amplicon thể đột biến.

Do đó, theo sáng chế các tác giả cung cấp các chuỗi axit nucleic peptit (PNA) có kích thước từ 16-25 mer (bảng 3) bắt cặp đặc hiệu với trình tự thể đại gen EGFR mã

NM_005228.3. Các PNA sẽ bắt cặp bổ sung với khu vực có đột biến trên các exon 18, 19, 20, 21. Đặc biệt các PNA còn cạnh tranh vị trí bắt cặp với các đầu dò phân tử đặc hiệu cho từng thể đột biến.

Do các chuỗi PNA một mặt có tính chất bắt cặp rất đặc hiệu với các trình tự axit nucleic bổ sung hình thành các lai ghép PNA/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 có độ dài 6 nucleotit), mặt khác nếu có sự khác biệt về trình tự giữa chuỗi PNA và phân tử ADN (chuyển ADN đột biến), tính ổn định của lai ghép PNA/ADN suy giảm rất mạnh làm giảm nhiệt độ tan chảy của các lai ghép này. Điều này có nghĩa khi sử dụng PNA 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 PNA (bảng 3) sẽ bị ức chế, chỉ các đoạn gen có trình tự khác biệt với chuỗi PNA (tức trình tự đột biến) mới được nhân lên. Trong trường hợp sử dụng sybrgreen, taqman probe, ethidium bromit, cyto-9 để phát hiện sự có mặt của amplicon thì tín hiệu huỳnh quang sẽ tương quan với hàm lượng amplicon đột biến được khuếch đại.

Theo một phương án của sáng chế, lượng peptit kẹp phân tử dùng trong PCR định lượng nằm trong khoảng từ 2,5pmol/μl đến 25 pmol/μl và ngưỡng phát hiện đối với từng đột biến EGFR mã NM 005228.3 tại các vị trí exon 18, 19, 20, 21 là 0,1%.

Bảng 1: Danh sách các trình tự mồi để khuếch đại khu vực có nghi ngờ đột biến gen EGFR mã NM 005228.3 tại các vị trí exon 18, 19, 20 và 21

Số trình tự	Ký hiệu	Trình tự
SEQ ID NO.1	Tr-Ex18-F1	tccaaatgagctggcaagtg
SEQ ID NO.2	Tr-Ex18-F2	tccttccaaatgagctggcaagtg
SEQ ID NO.3	Tr-Ex18-F3	ttccaaatgagctggcaagtgccgt
SEQ ID NO.4	Tr-Ex18-R1	tcccaaacactcagtgaacaaa
SEQ ID NO.5	Tr-Ex18-R2	ccaaacactcagtgaacaaagag
SEQ ID NO.6	Tr-Ex18-R3	gtttcccaaacactcagtgaacaa
SEQ ID NO.7	Tr-Del 19-F1	gtgcatcgctgtaacatcc
SEQ ID NO.8	Tr-Del 19-F2	gggtgcatcgctggtaa
SEQ ID NO.9	Tr-Del 19-F3	atcgctgtaacatccacc

SEQ ID NO.10	Tr-Del 19-R1	tgaggttcagagccatggac
SEQ ID NO.11	Tr-Del 19-R2	ggttcagagccatggaccc
SEQ ID NO.12	Tr-Del 19-R3	gcctgaggttcagagccatgg
SEQ ID NO.13	Tr-E20-F1	gcattcatgcgtcttcacctg
SEQ ID NO.14	Tr-E20-F2	atcgcattcatgcgtcttcac
SEQ ID NO.15	Tr-E20-F3	gcgtcttcacctggaaggggt
SEQ ID NO.16	Tr-E20-R1	atagtccaggaggcagccgaag
SEQ ID NO.17	Tr-E20-R2	caggaggcagccgaagggca
SEQ ID NO.18	Tr-E20-R3	tgtgttcccgacatagtccagga
SEQ ID NO.19	Tr-E21-F1	gcataaactacttgaggac
SEQ ID NO.20	Tr-E21-F2	aggcatgaactacttgag
SEQ ID NO.21	Tr-E21-F3	ctacttgaggaccgtcgt
SEQ ID NO.22	Tr-E21-R1	acctaaagccacctccttac
SEQ ID NO.23	Tr-E21-R2	ctaaagccacctccttacttg
SEQ ID NO.24	Tr-E21-R3	caggaaaatgctggctgacctaaag

Bảng 2: Danh sách các trình tự đầu dò phân tử đặc hiệu cho thể đại và thể đột biến gen EGFR

Số trình tự	Ký hiệu	Trình tự
SEQ ID NO.25	Tr-Ex18total-probe	ccaagctctcttgaggatcttg
SEQ ID NO.26	Tr-E18-G719C-probe1	accggagc[A]cagcactt
SEQ ID NO.27	Tr-E18-G719C-probe2	aaccggagc[A]cagcacttg
SEQ ID NO.28	Tr-E18-G719S-probe1	Accggagc[T]cagcactt
SEQ ID NO.29	Tr-E18-G719S-probe2	aaccggagc[T]cagcacttg
SEQ ID NO.30	Tr-Ex19total-probe	ttaa[C]t[T][T][C]t[C]a[C]ct
SEQ ID NO.31	Tr-E746-A750del-1-probe1	ctatcaa[A]a[C]atctccgaaagc
SEQ ID NO.32	Tr-E746-A750del-1-probe2	cgctcgctatcaaaacatctccgaaagccaa
SEQ ID NO.33	Tr-E746-A750del-2-probe1	cgctatcaa[G]acatctccg
SEQ ID NO.34	Tr-E746-A750del-2-probe2	ccgctcgctatcaagacatctccgaaagc
SEQ ID NO.35	Tr-L747-A750del T751S-probe1	ctat[C]aag[G]aa[T][c]atctcc
SEQ ID NO.36	Tr-L747-A750del T751S-probe2	tcgctatcaaggaatcatctccgaaagc
SEQ ID NO.37	Tr-L747-S752del P753S-probe1	ctatcaaggaat[C]gaaagcca
SEQ ID NO.38	Tr-L747-S752del P753S-probe2	cgctcgctatcaaggaatcgaaagccaac
SEQ ID NO.39	Tr-L747-E749del A750P-probe1	atcaaggaa[C]caacatctcc

SEQ ID NO.40	Tr-L747-E749del A750P-probe2	tcgctatcaaggaaccaacatctccgaaagc
SEQ ID NO.41	Tr-L747-S752del E746V-probe1	tatcaagggt[C]cgaaagcca
SEQ ID NO.42	Tr-L747-S752del E746V-probe2	tcgctatcaagggtccgaaagccaacaaggaaatc
SEQ ID NO.43	Tr-exon20-total probe	tgctgggcatctgcctcacct
SEQ ID NO.44	TR-T790M-probe 1	ctcatca[T]gcagctcatg
SEQ ID NO.45	TR-T790M-probe 2	tgcagctcatcatgcagctcatgccctt
SEQ IDNO.46	Tr-Ex21total-probe	cca[G]gaa[C]gta[C]tg
SEQ ID NO.47	TR_E21-L858Rp-Probe1	tttggcc[C]gccccaa
SEQ ID NO.48	TR_E21 -L858Rp-Probe2	tttggcc[C]gccccaaat
SEQ ID NO.49	TR-E21_L861 Qp-Probe1	accagc[T]gttt[G]
SEQ ID NO.50	TR-E21_L861 Qp-Probe2	cgcacccagc[T]gttt[G]

Các vị trí trong ngoặc [] là các axit nucleic khóa.

Bảng 3: Danh sách các trình tự axit nucleic peptit (PNA) được dùng làm kẹp phân tử ức chế sự khuếch đại đoạn gen EGFR thể đại

Số trình tự	Ký hiệu	Trình tự
SEQ ID NO.51	TR-PNA-E18-1	gagcccagcacttt
SEQ ID NO.52	TR-PNA-E18-2	ggagcccagcactttg
SEQ ID NO.53	TR-PNA-E18-3	ggagcccagcactttga
SEQ ID NO.54	TR-PNA-E18-4	ccggagcccagcactttga
SEQ ID NO.55	TR-PNA-E19-1	agatgttgcttctcttaa
SEQ ID NO.56	TR-PNA-E19-2	gagatgttgcttctctt
SEQ ID NO.57	TR-PNA-E19-3	gatgttgcttctcttaat
SEQ ID NO.58	TR-PNA-E20-1	ctcatcacgcagctca
SEQ ID NO.59	TR-PNA-E20-2	tcatacacgcagctcat
SEQ ID NO.60	TR-PNA-E20-3	gctcatcacgcagctc
SEQ ID NO.61	TR-PNA-E21-1	cagcagtttggccagccc
SEQ ID NO.62	TR-PNA-E21-2	agcagtttggccagccca
SEQ ID NO.63	TR-PNA-E21-3	ccagcagtttggccagcc

Định lượng tỷ lệ đột biến trong mẫu bệnh phẩm: Để kiểm chứng sự ổn định của các vật tư xét nghiệm trong mỗi phản ứng chẩn đoán, tác giả sáng chế đã thiết kế mẫu chuẩn dương (calibrator), chứa 1-50% ADN đột biến khi tiến hành xét nghiệm ta thực hiện phản ứng realtime PCR trên mẫu chứng âm (mẫu biết trước không có đột biến

gen EGFR), mẫu nội chuẩn (calibrator - biết trước tỷ lệ đột biến gen EGFR) và mẫu bệnh phẩm cần phát hiện đột biến gen EGFR và khi đó có thể tính được tỷ lệ đột biến trong mẫu bệnh phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phát hiện đột biến EGFR tại exon 18 trên các mẫu chuẩn đã biết tỷ lệ đột biến (50-1%)

a. Xử lý mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm dạng khối nền (paraffin block) được nghiền trong ống eppendorf 1,5ml chứa 800 µl xylen, lắc đều 15 phút nhằm hòa tan khối parafin.

- Pellet mẫu bằng cách ly tâm tốc độ tối đa (16 000 x g) trong 3 phút. Hút bỏ dịch nổi xylen.

- Lặp lại các bước 1 và 2 cho đến khi toàn bộ khối parafin được hoàn tan (thông thường quá trình này cần ít nhất 3 lần lặp lại, hoặc có thể ủ xylen qua đêm cho đến khi khối mô mềm như mô tươi).

- Bổ sung 800 µl ethanol 100% (v/v), lắc đều sau đó ly tâm tiếp 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl ethanol 70%, lắc kỹ và tiếp tục ly tâm 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl ethanol 50% lắc kỹ và ly tâm 5 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

b. Tách ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm

- Bổ sung 300 µl NaOH 200 mM + SDS 2% , ủ 95°C trong 10 phút, trung hòa bằng 200 µl Tris-HCl 1M pH 4,2-4,6 sau đó bổ sung 10 µl Protein K ủ 56°C trong 30 phút, bổ sung 400 µl dung dịch phenol: cloroform: isoamylalchole (25:24:1).

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu dịch nổi.

- Bổ sung 70% thể tích isopropanol, để tủa ở nhiệt độ phòng 15 phút.

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu kết tủa.

- Bổ sung 800 µl cồn 70% rửa 2 lần (ly tâm tốc độ tối đa), loại bỏ dịch nổi

- Hòa tan lượng ADN trong 100 µl 50mM Tris HCl-EDTA pH8 và dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến gen EGFR.

c. Phát hiện đột biến tại vị trí exon 18 của gen EGFR

Đột biến tại vị trí Exon 18 được phát hiện bằng phản ứng realtime PCR bằng

cách sử dụng cặp mồi Tr-Ex18-F1 và Tr-Ex18-R2 với sự có mặt của chuỗi PNA đặc hiệu exon 18 là Tr-E18-Ex18G719C-1 cùng với sự có mặt của đầu dò phân tử đặc hiệu cho thể đột biến Tr-Ex18total-probe. Khi đó kết quả định lượng các mẫu chuẩn với nồng độ biết trước đột biến EGFR exon18 được thể hiện trên hình 2.

Ví dụ 2: Phát hiện đột biến EGFR tại exon 19 trên các mẫu chuẩn đã biết tỷ lệ đột biến (50-1%)

a. Xử lý mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm dạng khối nền (paraffin block) được nghiền trong ống eppendorf 1,5ml chứa 800 µl xylen, lắc đều 15 phút nhằm hòa tan khối parafin.

- Pellet mẫu bằng cách ly tâm tốc độ tối đa (16 000 x g) trong 3 phút. Hút bỏ dịch nổi xylen.

- Lặp lại các bước 1 và 2 cho đến khi toàn bộ khối parafin được hoàn tan (thông thường quá trình này cần ít nhất 3 lần lặp lại, hoặc có thể ủ xylen qua đêm cho đến khi khối mô mềm như mô tươi).

- Bổ sung 800 µl etanol 100% (v/v), lắc đều sau đó ly tâm tiếp 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 70%, lắc kỹ và tiếp tục ly tâm 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 50% lắc kỹ và ly tâm 5 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

b. Tách ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm

- Bổ sung 300 µl NaOH 200 mM + SDS 2% , ủ 95°C trong 10 phút, trung hòa bằng 200 µl Tris-HCl 1M pH 4,2-4,6 sau đó bổ sung 10 µl Protein K ủ 56°C trong 30 phút, bổ sung 400 µl dung dịch phenol: cloroform: isoamylalchole (25:24:1).

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu dịch nổi.

- Bổ sung 70% thể tích isopropanol, để tủa ở nhiệt độ phòng 15 phút.

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu kết tủa.

- Bổ sung 800 µl cồn 70% rửa 2 lần (ly tâm tốc độ tối đa), loại bỏ dịch nổi

- Hòa tan lượng ADN trong 100 µl 50mM Tris HCl-EDTA pH8 và dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến gen EGFR.

c. Phát hiện đột biến tại vị trí exon 19 E746-A750del của gen EGFR

Đột biến tại vị trí exon 19 E746-A750del được phát hiện bằng phản ứng realtime

PCR bằng cách sử dụng cặp mồi TR-Del19-F1 và TR-Del19-R2 với sự có mặt của một trong các chuỗi PNA đặc hiệu exon 19 là TR-PNA-E19-1 cùng với sự có mặt của đầu dò phân tử đặc hiệu cho thể đột biến E746-A750del. Khi đó kết quả định lượng các mẫu chuẩn với nồng độ biết trước đột biến EGFR exon19 E746- A750del được thể hiện trên hình 3.

Ví dụ 3: Phát hiện đột biến EGFR tại exon 20 trên các mẫu chuẩn đã biết tỷ lệ đột biến (50-1%)

a. Xử lý mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm dạng khối nền (paraffin block) được nghiền trong ống eppendorf 1,5ml chứa 800 µl xylen, lắc đều 15 phút nhằm hòa tan khối parafin.

- Pellet mẫu bằng cách ly tâm tốc độ tối đa (16 000 x g) trong 3 phút. Hút bỏ dịch nổi xylen.

- Lặp lại các bước 1 và 2 cho đến khi toàn bộ khối parafin được hoàn tan (thông thường quá trình này cần ít nhất 3 lần lặp lại, hoặc có thể ủ xylen qua đêm cho đến khi khối mô mềm như mô tươi).

- Bổ sung 800 µl etanol 100% (v/v), lắc đều sau đó ly tâm tiếp 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 70%, lắc kỹ và tiếp tục ly tâm 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 50% lắc kỹ và ly tâm 5 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

b. Tách ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm

- Bổ sung 300 µl NaOH 200 mM + SDS 2% , ủ 95°C trong 10 phút, trung hòa bằng 200 µl Tris-HCl 1M pH 4,2-4,6 sau đó bổ sung 10 µl Protein K ủ 56°C trong 30 phút, bổ sung 400 µl dung dịch phenol: cloroform: isoamylalchole (25:24:1).

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu dịch nổi.

- Bổ sung 70% thể tích isopropanol, để tủa ở nhiệt độ phòng 15 phút.

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu kết tủa.

- Bổ sung 800 µl cồn 70% rửa 2 lần (ly tâm tốc độ tối đa), loại bỏ dịch nổi

- Hòa tan lượng ADN trong 100 µl 50mM Tris HCl-EDTA pH8 và dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến gen EGFR.

c. Phát hiện đột biến tại vị trí exon 20 của gen EGFR

Đột biến tại vị trí exon 20 được phát hiện bằng phản ứng realtime PCR dùng cặp mồi Tr-E20-F1 và Tr-E20-R1 kết hợp với chuỗi PNA đặc hiệu exon 20 như Tr-exon20-total probe cùng với sự có mặt của đầu dò phân tử đặc hiệu cho thể đột biến của exon 20 là TR-PNA-E20-1. Khi đó kết quả định lượng các mẫu chuẩn với nồng độ biết trước đột biến EGFR exon 20 được thể hiện trên hình 4.

Ví dụ 4: Phát hiện đột biến EGFR tại exon 21 trên các mẫu chuẩn đã biết tỷ lệ đột biến (50-1%)

a. Xử lý mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm dạng khối nền (paraffin block) được nghiền trong ống eppendorf 1,5ml chứa 800 µl xylen, lắc đều 15 phút nhằm hòa tan khối parafin.

- Pellet mẫu bằng cách ly tâm tốc độ tối đa (16 000 x g) trong 3 phút. Hút bỏ dịch nổi xylen.

- Lặp lại các bước 1 và 2 cho đến khi toàn bộ khối parafin được hoàn tan (thông thường quá trình này cần ít nhất 3 lần lặp lại, hoặc có thể ủ xylen qua đêm cho đến khi khối mô mềm như mô tươi).

- Bổ sung 800 µl etanol 100% (v/v), lắc đều sau đó ly tâm tiếp 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 70%, lắc kỹ và tiếp tục ly tâm 3 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 800 µl etanol 50% lắc kỹ và ly tâm 5 phút ở 14.000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi.

b. Tách ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm

- Bổ sung 300 µl NaOH 200 mM + SDS 2% , ủ 95°C trong 10 phút, trung hòa bằng 200 µl Tris-HCl 1M pH 4,2-4,6 sau đó bổ sung 10 µl Protein K ủ 56°C trong 30 phút, bổ sung 400 µl dung dịch phenol: cloroform: isoamylalchole (25:24:1).

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu dịch nổi.

- Bổ sung 70% thể tích isopropanol, để tủa ở nhiệt độ phòng 15 phút.

- Ly tâm tốc độ tối đa trong 20 phút, thu kết tủa.

- Bổ sung 800 µl cồn 70% rửa 2 lần (ly tâm tốc độ tối đa), loại bỏ dịch nổi

- Hòa tan lượng ADN trong 100 µl 50mM Tris HCl-EDTA pH8 và dùng làm khuôn cho phản ứng realtime PCR phát hiện đột biến gen EGFR.

c. Phát hiện đột biến tại vị trí exon 21 của gen EGFR

Đột biến tại vị trí exon 21 được phát hiện bằng phản ứng realtime PCR dùng cặp môi Tr-E21-F1 và Tr-E21-R1 kết hợp với chuỗi PNA đặc hiệu exon 21 là Tr- TR-PNA-E21-1 cùng với sự có mặt của đầu dò phân tử đặc hiệu cho thể đột biến của exon 21 là L858R. Khi đó kết quả định lượng các mẫu chuẩn với nồng độ biết trước đột biến EGFR exon 21 được thể hiện trên hình 5.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Bằng cách sử dụng đoạn môi đặc hiệu và peptit kẹp đặc hiệu, các tác giả đã phát triển quy trình phát hiện đột biến gen EGFR trên bệnh phẩm ung thư phổi cho phép phát hiện các đột biến gen EGFR mã NM_005228.3 tại các vị trí exon 18, 19, 20 hoặc 21 một cách riêng rẽ với mức độ đột biến đạt 0,1% trên lượng ADN tổng số trong mẫu bệnh phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phát hiện đột biến gen EGFR có mã NM_005228.3 tại vị trí exon 20 từ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư phổi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Khuếch đại gen bằng PCR trên máy PCR định lượng 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 và nước vừa đủ thể tích 25 µl, phản ứng PCR được tiến hành với chu trình nhiệt: 50°C trong 15 phút; 95°C trong 15 phút; (95°C trong 15 giây; 60 - 65°C trong 1 phút có ghi phổ huỳnh quang) X 50-55 chu kỳ; trong đó khác biệt ở chỗ:

- Mỗi xuôi là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14 và SEQ ID NO.15;

- Mỗi ngược là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.18;

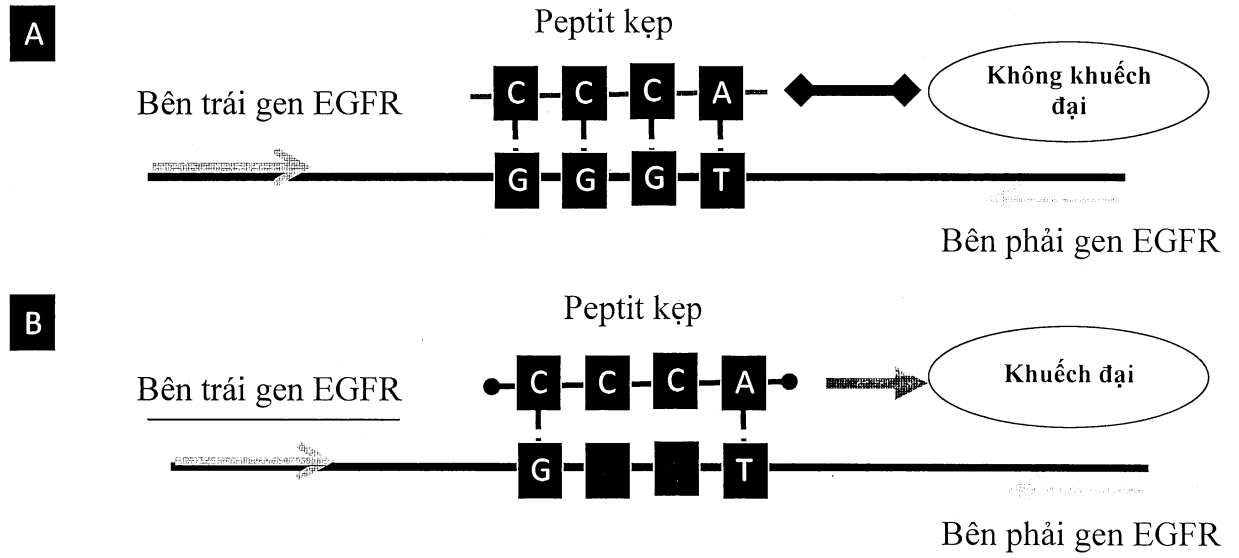
- Kẹp peptit phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.58, SEQ ID NO.59 và SEQ ID NO.60;

- Đầu dò phân tử là trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.44 và SEQ ID NO.45; và

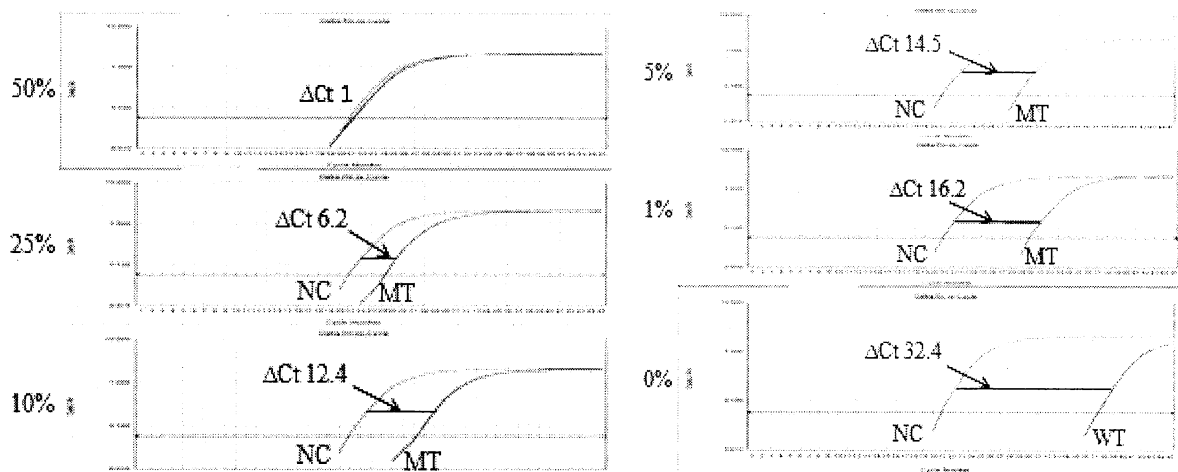
b) Phát hiện đột biến theo biểu đồ khuếch đại của mẫu trên máy PCR định lượng để xác định mức độ đột biến gen EGFR.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó lượng peptit kẹp phân tử dùng trong PCR định lượng nằm trong khoảng từ 2,5 pmol/µl đến 25 pmol/µl và ngưỡng phát hiện của đột biến gen EGFR có mã NM_005228.3 tại các vị trí exon 20 là 0,1%.

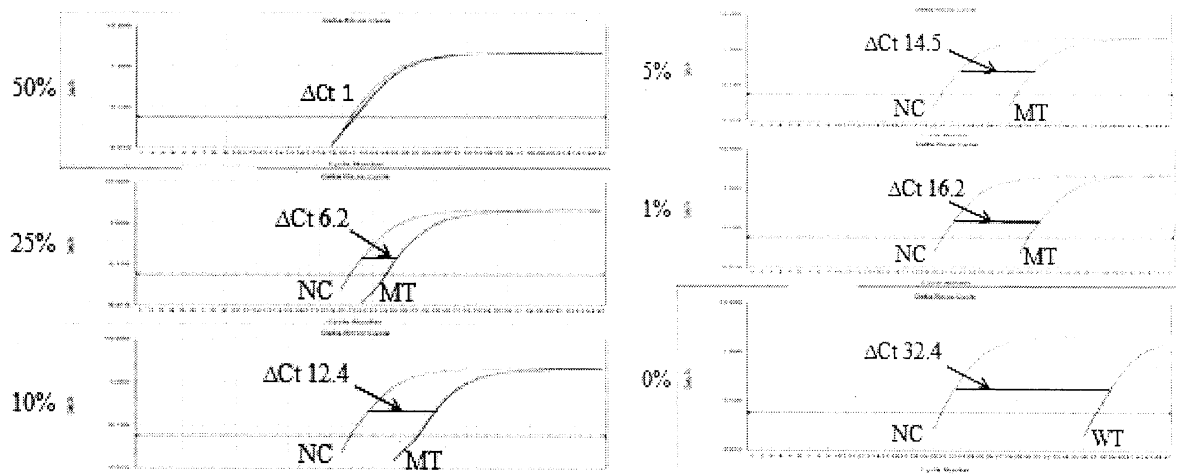
HÌNH 1



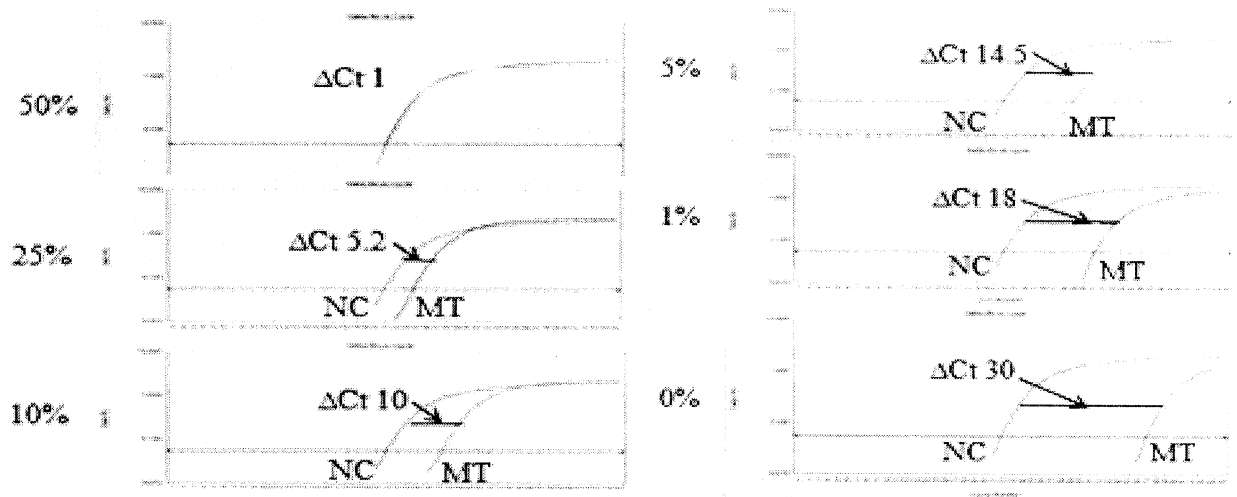
HÌNH 2



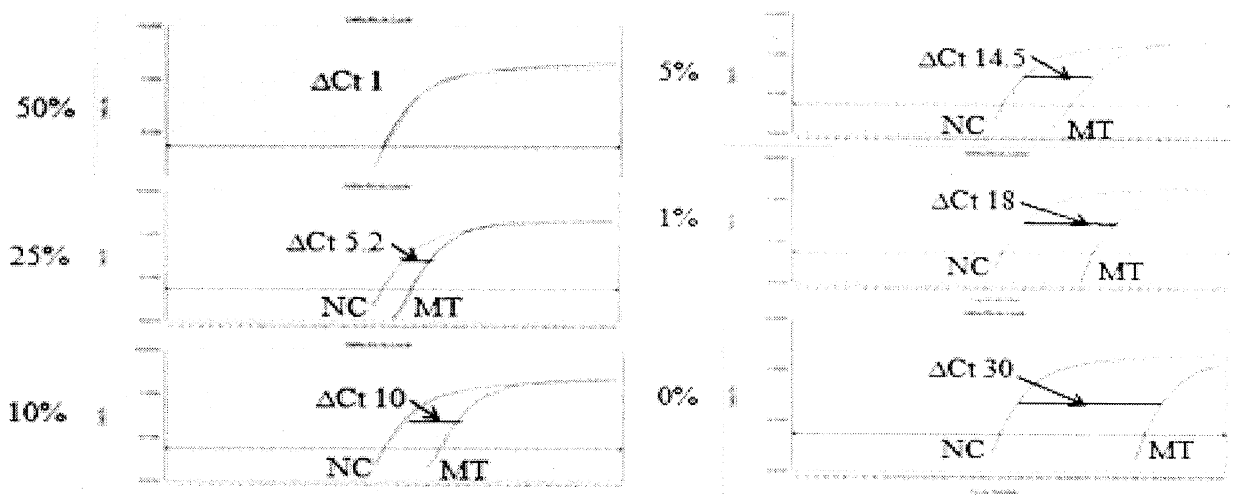
HÌNH 3



HÌNH 4



HÌNH 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Bệnh viện trung ương quân đội 108 (VN)
 <120> Quy trình phát hiện đột biến gen EGFR
 <130>
 <160> 63
 <170> Patent phiên bản 3.3

<210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mọi

<400> 1
 tccaaatgagctggcaagtg

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

<400> 2
 tccttccaaatgagctggcaagtg

<210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mọi

<400>3
 ttccaaatgagctggcaagtgccgt

<210> 4
 <210> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mọi

<400> 4
 tcccaaactcagtgaaacaaa

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> > Mọi

<400> 5
 ccaaactcagtgaaacaaagag

<210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> > Mọi

<400> 6
gtttcccaaacactcagtgaaacaa

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 7
gtgcatcgctggtaacatcc
<210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 8
gggtgcatcgctggtaa

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400>9
atcgctggtaacatccacc

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 10
tgagggttcagagccatggac

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 11
gggttcagagccatggaccc

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 12
gcctgagggttcagagccatgg

<210> 13
<211> 21

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223 > Mỗi

<400> 13
 gcattcatgcgtcttcacctg

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi

<400> 14
 atcgattcatgcgtcttcac

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi

<400> 15
 gcgtcttcacctggaaggggt

<210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi

<400>16
 atagtccaggaggcagccgaag

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi

<400> 17
 caggaggcagccgaagggca

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mỗi

<400> 18
 tgtgttcccggacatagtccagga

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

<400>19
gcatgaactacttggaggac

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 20
agggcataactacttggag

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 21
ctacttggaggaccgtcgct

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 22
acctaaagccacctccttac

<210> 23
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400>23
ctaaagccacctccttactttg

<210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi

<400> 24
caggaaaatgctggctgacctaaag

<210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<400>25
ccaagctctcttgaggatcttg

<210> 26
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 26
 accggagc[A]cagcactt

<210> 27
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 27
 aaccggagc[A]cagcacttg

<210> 28
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 28
 Accggagc[T]cagcactt

<210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 29
 aaccggagc[T]cagcacttg

<210> 30
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 30
 ttaa[C]t[T][T][C]t[C]a[C]ct

<210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 31
 ctatcaa[A]a[C]atctccgaaagc

<210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 32

cgctcgctatcaaaacatctccgaaagccaa

<210> 33

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 33

cgctatcaa[G]acatctccg

<210> 34

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 34

ccgtcgctatcaagacatctccgaaagc

<210> 35

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400>35

ctat[C]aag[G]aa[T][c]atctcc

<210> 36

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 36

tcgctatcaaggaatcatctccgaaagc

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 37

ctatcaaggaat[C]gaaagcca

<210> 38

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<400> 38

cgctcgctatcaaggaatcgaaagccaac

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 39
 atcaaggaa[C]caacatctcc

<210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 40
 tcgctatcaaggaaccaacatctccgaaagc

<210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 41
 tatcaagggtt[C]cgaaagcca

<210> 42
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 42
 tcgctatcaagggttccgaaagccaacaaggaaatc

<210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 43
 tgctgggcatctgcctcacct

<210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 44
 ctcacatca[T]gcagctcatg

<210> 45
 <211> 28

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 45
 tgcagctcatcatgcagctcatgccctt

<210> 46
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 46
 cca[G]gaa[C]gta[C]tg

<210> 47
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 47
 tttggcc[C]gcccaa

<210> 48
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 48
 tttggcc[C]gcccaaat

<210> 49
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 49
 acccagc[T]gttt[G]

<210> 50
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<400> 50
 cgcacccagc[T]gttt[G]

<210> 51
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 51
gagcccagcacttt

<210> 52
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử
<400> 52
ggagcccagcactttg

<210> 53
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 53
ggagcccagcactttga

<210> 54
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 54
ccggagcccagcactttga

<210> 55
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 55
agatgttgcttctcttaa

<210> 56
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 56
gagatgttgcttctctt

<210> 57
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 57
gatgttgcttctcttaaat

<210> 58
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 58
 ctcacacgcagctca

<210> 59
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 59
 tcacacgcagctcat

<210> 60
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 60
 gctcacacgcagctc

<210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 61
 cagcagtttggccagccc

<210> 62
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 62
 agcagtttggccagcca

<210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> axit nucleic peptit (PNA) làm kẹp phân tử

<400> 63
 ccagcagtttggccagcc