



(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) 
1-0021453

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **B**

(21) 1-2018-00576

(22) 08.02.2018

(45) 26.08.2019 377

(43) 26.04.2018 361

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN, ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Phan Tuấn Nghĩa (VN), Nguyễn Thị Hồng Loan (VN), Nguyễn Hòa Anh (VN)

(54) **KIT ĐỂ XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN ĐIỂM TRÊN GEN TY THỂ VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KIT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể và quy trình sản xuất kit này, cụ thể là sáng chế đề cập đến kit để phát hiện và định lượng 6 đột biến gen ty thể A3243G, G3380A, A8344G, T8993G, G11778A và T8993C trong cùng một điều kiện real-time PCR. Bằng cách thiết kế và tối ưu các đoạn mồi, tạo các mẫu đối chứng có tỷ lệ đột biến 50%, kit theo sáng chế cho phép phát hiện và định lượng được 6 đột biến điểm A3243G, G3380A, A8344G, T8993C, T8993G và G11778A trên gen ty thể. Kit theo sáng chế cho phép chuẩn hóa quy trình xét nghiệm trong chẩn đoán đột biến gen ty thể gây bệnh nhằm hỗ trợ công tác chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền cho bệnh nhân.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh, cụ thể là đề cập đến kit dùng để xác định đột biến điểm trên gen ty thể và quy trình sản xuất kit dùng trong real-time PCR để phát hiện và định lượng đột biến điểm trên gen ty thể để phát hiện và định lượng 6 đột biến gen ty thể phổ biến A3243G, G3380A, A8344G, T8993C, T8993G và G11778A trong cùng một điều kiện phân tích. Kit theo sáng chế cho phép chuẩn hóa quy trình xét nghiệm trong chẩn đoán đột biến gen ty thể gây bệnh nhằm hỗ trợ công tác chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền cho bệnh nhân.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ty thể là bào quan có ở hầu hết các tế bào sinh vật nhân thật, là nhà máy tạo năng lượng chủ yếu cho các hoạt động sống của tế bào, cơ thể; ty thể có hệ gen riêng (mtDNA), nhân bản độc lập với hệ gen nhân (nDNA). mtDNA được di truyền từ mẹ sang con. Tuy nhiên, tỷ lệ số bản sao mang đột biến ở mẹ và con khác nhau, các cá thể mang đột biến trong một phả hệ gia đình cũng có sự thay đổi về tần suất đột biến. Ngoài ra, mtDNA có tốc độ đột biến cao gấp 10-20 lần so với nDNA (do đặc trưng cấu trúc, hoạt động chức năng của ty thể và khả năng kiểm soát sai sót khi nhân bản của mtDNA). Hầu hết các đột biến gen ty thể đều khiến suy giảm chức năng tạo năng lượng của ty thể, từ đó gây nên các hội chứng bệnh khác nhau, tập trung chủ yếu ở cơ, thần kinh và chức năng chuyển hóa của cơ thể.

Hiện nay, đã có một số công trình sử dụng real-time PCR để phát hiện và định lượng các đột biến gen ty thể phổ biến bao gồm đột biến A thành G tại vị trí 3243 trên gen ty thể ký hiệu là A3243G, tương tự với G11778A, G3380A, T8993G, T8993C, A8344G thuộc các hội chứng điển hình (MELAS, Leigh, MERRF, LHON). WO2004/092415 đã đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến tại vị trí 3243 trên gen ty thể gây hội chứng MELAS bằng PCR. Trong đó, các mẫu nhân bản đoạn gen có mang đột biến có chiều dài từ 12 đến 30 nucleotit được thiết kế tại vị trí 3243 trên gen ty thể; các mẫu dò với chiều dài từ 14 đến 40 nucleotit tại vị trí 3230 trên gen ty thể, đầu 3' được phosphat hóa và đầu 5' được gắn với huỳnh quang BODIPY FL có bước sóng kích thích và phát quang tại lần lượt tại bước sóng 490 nm và 530 nm. Nghiên

cứu của Singh và cộng sự (2006) cũng công bố phát hiện và định lượng đột biến A3243G trên gen ty thể bằng real-time PCR, nhưng trình tự của mẫu dò tại đầu 5' được gắn với huỳnh quang VIC (mẫu dò cho gen không đột biến) và 6FAM (mẫu dò cho gen mang đột biến); còn đầu 3' gắn với protein MGB (Minor groove binding protein) giúp tăng độ đặc hiệu của phản ứng PCR. Truong và cộng sự (2014) cũng đã phát hiện và định lượng đột biến A3243G bằng real-time PCR bằng cách sử dụng mẫu dò huỳnh quang nucleotit dạng cầu khóa LNA. Nghiên cứu của Tajima và cộng sự (2007) đã phát hiện và định lượng đột biến 8993T/G trên gen ty thể, gây hội chứng Leigh bằng real-time PCR, nhưng sử dụng mẫu dò với trình tự từ vị trí 8983 trên gen ty thể và được đánh dấu bằng huỳnh quang VIC và FAM. Shuhai và cộng sự (2001) đã định lượng đột biến A8344G trên gen ty thể gây hội chứng MERRF bằng real-time PCR, nhưng sử dụng cặp mồi nhân đột biến tại trình tự 8259-8281 (mồi xuôi) và 8396-8371 (mồi ngược) với mẫu dò được thiết kế tại vị trí 8334-8353 và được gắn với huỳnh quang TET (mẫu dò cho gen không mang đột biến) và FAM (mẫu dò cho gen mang đột biến) ở đầu 5' và DABCYL dập tắt huỳnh quang tại đầu 3'. Wang và cộng sự (2008) đã phát hiện nhanh đột biến G11778A trên gen ty thể gây hội chứng LHON sử dụng real-time PCR với mẫu dò gắn MGB. Cặp mồi nhân đoạn gen đột biến được thiết kế tại vị trí 11724-11749 (mồi xuôi), 11792-11816 (mồi ngược) và các mẫu dò tại vị trí 11767-117783 có gắn huỳnh quang FAM, VIC ở đầu 5' và MGB tại đầu 3'.

Tuy nhiên, các công bố trên chỉ dừng lại nghiên cứu từng đột biến riêng lẻ (Szuhai và cộng sự, 2001, Truong và cộng sự, 2014) hoặc phân tích trên một số trường hợp bệnh nhân dương tính (Wang và cộng sự, 2008) hoặc sử dụng trình tự mồi và mẫu dò gắn huỳnh quang khác nhau (Szuhai và cộng sự, 2001; Singh và cộng sự, 2006; Tajima và cộng sự, 2007; Wang và cộng sự, 2008). Ngoài ra, các điều kiện chạy PCR đối với từng đột biến là rất khác nhau, do đó, để ứng dụng kỹ thuật PCR trong chẩn đoán, phát hiện các đột biến này thì kỹ thuật viên phải ghi nhớ và thao tác với các mẫu khác nhau, dễ gây nhầm lẫn và dẫn đến hiệu quả sàng lọc chưa cao. Trong khi đó, để xác định các đột biến liên quan đến các bệnh di truyền, cụ thể là phát hiện cả 6 đột biến này để sàng lọc các hội chứng MELAS, Leigh, MERRF, LHON đang là nhu cầu cấp thiết. Hơn thế nữa, hiện chưa có kit thương mại có thể sử dụng để định lượng và phát hiện được 6 đột biến điểm này.

Mặt khác, do tính phức tạp trong tác động lâm sàng, mô bệnh học, cơ chế phát sinh và biểu hiện bệnh nên việc chẩn đoán gặp khó khăn nếu không dựa vào phân tích gen. Bộ kit real-time PCR nhằm phát hiện và định lượng 6 đột biến gen ty thể phổ biến (A3243G, G3380A, A8344G, T8993C, T8993G và G11778A) sẽ hỗ trợ phát hiện nguyên nhân gây bệnh và góp phần tư vấn di truyền với các trường hợp mang đột biến.

Do đó, cần có nhu cầu chuẩn hóa quy trình xét nghiệm cũng như cần kit sử dụng để phát hiện và định lượng 6 đột biến gen ty thể phổ biến bao gồm A3243G, G3380A, A8344G, T8993C, T8993G và G11778A theo hướng đơn giản, dễ sử dụng, giúp chẩn đoán nhanh chóng các đột biến liên quan đến bệnh MELAS, Leigh, MERRF, LHON trên gen ty thể ở bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, theo đó, sáng chế đề xuất kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể và quy trình sản xuất kit này. Kit theo sáng chế được tối ưu hóa các điều kiện phản ứng và sử dụng mẫu dò huỳnh quang để có thể xác định được đồng thời một hoặc nhiều đột biến điểm trên gen ty thể gây bệnh nhằm hỗ trợ công tác chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền cho bệnh nhân.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể, trong đó kit này bao gồm:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (µl)	Tổng (µl)
1	MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/µl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/µl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/µl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/µl	100	
		Đệm TE	100	
2	ĐC1 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	50	50
3	ĐC2 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ	50	50

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
		độ 5×10^4 plasmit/μl		
4	ĐC3 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
5	ĐC4 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
6	ĐC A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5, nồng độ 4 pg/μl	200	200
7	MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
8	ĐC1 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
9	ĐC2 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
10	ĐC3 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
11	ĐC4 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
12	ĐC G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11, nồng độ 4 pg/μl	200	200
13	MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
14	ĐC1 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
15	ĐC2 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
16	ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.20 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/ml	50	50
17	ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
18	ĐC A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17, nồng độ 4 pg/μl	200	200
19	MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
20	ĐC1 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
21	ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
22	ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
23	ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
24	ĐC T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
25	MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmo/μl	100	
		Đệm TE	100	
26	ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
27	ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
28	ĐC3 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
29	ĐC4 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
30	ĐC T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200
31	MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	10	
		Đệm TE	100	
32	ĐC1 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
33	ĐC2 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
34	ĐC3	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit	50	50

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	G11778A	chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl		
35	ĐC4 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
36	ĐC G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31, nồng độ 4 pg/μl	200	200.

Theo một phương án ưu tiên, kit theo sáng chế còn chứa thêm 1,2 ml nước loại ion đã khử trùng và hướng dẫn sử dụng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo các mẫu đối chứng dương:

- biến nạp riêng rẽ 11 plasmit pJET 1.2 tái tổ hợp lần lượt chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.31 và SEQ ID NO.32 vào chủng *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc LB chứa 30 đến 70 μg/μl ampicilin để thu chủng *E. coli* DH5α chuyển gen, sau đó chủng *E. coli* DH5α biến nạp được nuôi cấy thu tế bào;

- chuẩn hóa lượng plasmit bằng cách chiết plasmit ra khỏi tế bào *E. coli* DH5α biến nạp, tiếp đến định lượng plasmit cho mỗi mẫu với nồng độ $5 \cdot 10^3$, 5×10^4 , 5×10^5 và 5×10^6 plasmit/μl;

- phối trộn thu các mẫu đối chứng bằng cách phối trộn plasmit mang gen đột biến và plasmit không mang đột biến cho mỗi nồng độ theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmit/μl)	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
ĐC1 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^3	25	
ĐC2 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^4	25	
ĐC3	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^5	25	50

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmit/ μ l)	Thể tích (μ l)	Tổng (μ l)
A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^5	25	
ĐC4 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^6	25	
ĐC1 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^3	25	
ĐC2 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^4	25	
ĐC3 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^5	25	
ĐC4 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^6	25	
ĐC1 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^3	25	
ĐC2 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^4	25	
ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^5	25	
ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^6	25	
ĐC1 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^3	25	
ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^4	25	
ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^5	25	
ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^6	25	
ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^3	25	
ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^4	25	
ĐC3	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	50

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmid/ μ l)	Thể tích (μ l)	Tổng (μ l)
T8993C	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^5	25	
ĐC4 T8993C	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^6	25	
ĐC1 G11778A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^3	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^3	25	
ĐC2 G11778A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^4	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^4	25	
ĐC3 G11778A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^5	25	50
	plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^5	25	
ĐC4 G11778A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^6	25	50
	plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^6	25	

b) tạo các mẫu đối chứng âm:

- Định lượng plasmid tương ứng chứa trình tự SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.31 đã được tạo ra ở bước a) đến nồng độ 2 pmol/ μ l;

- Tạo các mẫu đối chứng âm tương ứng theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (pg/ μ l)	Định lượng (μ l)
ĐCA3243G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.5	4	200
ĐCG3380A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11	4	200
ĐCA8344G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.17	4	200
ĐCT8993G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCT8993C	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCG11778A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.31	4	200

c) Tạo hỗn hợp phản ứng PCR:

- Tạo các đoạn mồi bằng cách tổng hợp và định lượng trình tự nucleotit có trình tự nêu trong bảng sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/μl)
1	CCACACCCACCCAAGAACAG	SEQ ID NO.1	10
2	AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT	SEQ ID NO.2	10
3	GGCCAACCTCCTACTCCTCAT	SEQ ID NO.7	10
4	CCTACAACGTTGGGGCCTTTG	SEQ ID NO.8	10
5	AGCCCACTGTAAAGCTAAC	SEQ ID NO.13	10
6	GGCATTTTCACTGTAAAGAGGT	SEQ ID NO.14	10
7	CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA	SEQ ID NO.19	10
8	CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG	SEQ ID NO.20	10
9	CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC	SEQ ID NO.27	10
10	GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC	SEQ ID NO.28	10

- Tạo các đoạn dò bằng cách tổng hợp, định lượng và gắn đầu dò huỳnh quang theo bảng sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/μl)	Đầu dò huỳnh quang
1	CCGGGCTCTGCCAT	SEQ ID NO.3	2	HEX
2	CCGGGCCCTGCCAT	SEQ ID NO.4	2	FAM
3	ATTTTTTCGTTCCGT	SEQ ID NO.9	2	HEX
4	ATTTTTTTGTTCCGT	SEQ ID NO.10	2	FAM
5	AGATTAAGAGAACC	SEQ ID NO.15	2	HEX
6	GATTAAGAGAGCC	SEQ ID NO.16	2	FAM
7	AATAGCCCTGGCC	SEQ ID NO.21	2	HEX
8	AATAGCCCGGGCCGT	SEQ ID NO.22	2	FAM
9	ATAGCCCCGGCCGT	SEQ ID NO.25	2	FAM
10	ATGATGCGACTGTG	SEQ ID NO.29	2	HEX
11	ATGATGTGACTG	SEQ ID NO.30	2	FAM

- phối trộn thu hỗn hợp phản ứng theo từng thành phần theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/μl	100	
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2	100	

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	pmol/μl		
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	

d) Tạo kit bằng cách đóng gói các thành phần được chuẩn bị từ bước a) đến bước c) theo các nhóm như sau:

stt	Ký hiệu	Số lượng(ống)	Nhóm
1	MXA3243G	1	1 Xác định đột biến điểm A3243G
2	ĐC1A3243G	1	
3	ĐC2A3243G	1	
4	ĐC3A3243G	1	
5	ĐC4A3243G	1	
6	ĐCA3243G	1	
7	MXG3380A	1	2 Xác định đột biến điểm G3380A
8	ĐC1G3380A	1	
9	ĐC2G3380A	1	
10	ĐC3G3380A	1	
11	ĐC4G3380A	1	
12	ĐCG3380A	1	
13	MXA8344G	1	3 Xác định đột biến điểm A8344G
14	ĐC1A8344G	1	
15	ĐC2A8344G	1	
16	ĐC3A8344G	1	
17	ĐC4A8344G	1	
18	ĐCA8344G	1	
19	MXT8993G	1	4 Xác định đột biến điểm T8993G
20	ĐC1T8993G	1	
21	ĐC2T8993G	1	
22	ĐC3T8993G	1	
23	ĐC4T8993G	1	
24	ĐCT8993G	1	

stt	Ký hiệu	Số lượng(ống)	Nhóm
25	MXT8993C	1	5 Xác định đột biến điểm T8993C
26	ĐC1T8993C	1	
27	ĐC2T8993C	1	
28	ĐC3T8993C	1	
29	ĐC4T8993C	1	
30	ĐCT8993C	1	
31	MXG11778A	1	6 Xác định đột biến điểm G11778A.
32	ĐC1G11778A	1	
33	ĐC2G11778A	1	
34	ĐC3G11778A	1	
35	ĐC4G11778A	1	
36	ĐCG11778A	1	

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại và biểu đồ sự tương quan giữa chu kì ngưỡng và logarit số bản sao ban đầu của đột biến A3243G.

Hình 2 là kết quả real-time PCR thể hiện đường cong khuếch đại các mẫu bệnh phẩm không mang các đột biến A3243G.

Hình 3 là đường cong khuếch đại phản ứng real-time PCR một trường hợp dương tính với A3243G và các đoạn gen khác không mang đột biến A3243G trên hệ gen ty thể.

Hình 4 là biểu đồ đường cong khuếch đại phản ứng real-time PCR khi sử dụng khuôn là 1% tỷ lệ đột biến A3243G.

Hình 5 là kết quả real-time PCR của kit sau 7 ngày bảo quản ở 25°C. Biểu đồ đường cong khuếch đại (hình 5A) và biểu đồ tương quan tuyến tính giữa logarit số bản sao ban đầu và chu kì ngưỡng của đột biến A3243G (hình 5B).

Hình 6 là kết quả real-time PCR của kit sau 20 ngày bảo quản ở 4°C. Biểu đồ đường cong khuếch đại (hình 6A) và biểu đồ tương quan tuyến tính giữa logarit số bản sao ban đầu và chu kì ngưỡng của đột biến A3243G (hình 6B).

Hình 7 là kết quả real-time PCR của kit sau 6 tháng ở -20°C . Biểu đồ đường cong khuếch đại (hình 7A) và biểu đồ tương quan tuyến tính giữa logarit số bản sao ban đầu và chu kì ngưỡng của đột biến A3243G (hình 7B).

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Các quy trình, kỹ thuật chiết ADN, chiết plasmit, tổng hợp mồi, kỹ thuật biến nạp, nuôi cấy và chọn lọc các chủng vi khuẩn biến nạp được sử dụng theo sáng chế là những kỹ thuật đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ để chiết ADN từ huyết thanh người hoặc chiết plasmit từ tế bào *E. coli* được thực hiện theo kỹ thuật chuẩn hoặc được thực hiện bằng cách sử dụng kit thương mại và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chủng *E. coli* DH5 α khả biến được sử dụng theo sáng chế là chủng tế bào thương mại của Invitrogen, Hoa Kỳ, plasmit pJET1.2 là plasmit thương mại của Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ. Plasmit pJET 1.2 mang các đoạn gen tái tổ hợp đã được tạo ra bằng các kỹ thuật chuẩn. Các chủng *E. coli* DH5 α mang plasmit pJET 1.2 chứa các đoạn gen A3243, A3243G, G3380, G3380A, A8344, A8344G, T8993, T8993G, T8993C, G11778 và G11778A, hiện đang được lưu giữ tại Phòng Protein tái tổ hợp, Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội.

Các thành phần hóa chất sử dụng theo sáng chế là các thành phần được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, dung dịch đệm, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza có thể mua được từ các công ty, ví dụ, từ các hãng Invitrogen, Hoa Kỳ hoặc từ Enzygnomic, Hàn Quốc.

Plasmit theo sáng chế chỉ plasmit pJET 1.2 tái tổ hợp được tạo ra bởi *E. coli* DH5 α , khi đề cập đến plasmit chứa trình tự xác định chỉ plasmit pJET 1.2 chứa trình tự mong muốn cụ thể, ví dụ, plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 chỉ plasmit pJET 1.2 chứa trình tự SEQ ID NO.5 tái tổ hợp.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến để xác định đột biến điểm trên gen ty thể, trong đó kit này bao gồm:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (µl)	Tổng (µl)
1	MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/µl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/µl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/µl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/µl	100	
		Đệm TE	100	
2	ĐC1 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	50	50
3	ĐC2 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/µl	50	50
4	ĐC3 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/µl	50	50
5	ĐC4 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/µl	50	50
6	ĐC A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5, nồng độ 4 pg/µl	200	200
7	MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/µl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/µl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/µl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/µl	100	
		Đệm TE	100	
8	ĐC1 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	50	50

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
9	ĐC2 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
10	ĐC3 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
11	ĐC4 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
12	ĐC G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11, nồng độ 4 pg/μl	200	200
13	MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
14	ĐC1 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
15	ĐC2 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
16	ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.20 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/ml	50	50
17	ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
18	ĐC A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17, nồng độ 4 pg/μl	200	200
19	MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
		Đệm TE	100	
20	ĐC1 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
21	ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
22	ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
23	ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
24	ĐC T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200
25	MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmo/μl	100	
		Đệm TE	100	
26	ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
27	ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
28	ĐC3 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
29	ĐC4 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
30	ĐC T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200
31	MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
		Môi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	10	
		Đệm TE	100	
32	ĐC1 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
33	ĐC2 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
34	ĐC3 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
35	ĐC4 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
36	ĐC G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31, nồng độ 4 pg/μl	200	200.

Kit theo sáng chế có khả năng xác định được đồng thời 6 đột biến điểm trên gen ty thể của người liên quan đến các hội chứng MELAS, Leigh, MERRF và LHON bởi đột biến điểm tại các vị trí A3243G, G3380A, A8344G, T8993G, T8993C và G11778A với cùng điều kiện chạy real-time PCR. Ngoài ra, kit theo sáng chế có thể định lượng được tỷ lệ đột biến, để từ đó giúp chẩn đoán, điều trị và tư vấn bệnh liên quan đến đột biến gen ty thể.

Thành phần MXA3243G đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm A3243G, trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn môi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Môi xuôi: 5'-CCACACCCACCCAAGAACAG-3' SEQ ID NO.1
 Môi ngược: 5'-AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT-3' SEQ ID NO.2
 Mẫu dò không đột biến: 5'-CCGGGCTCTGCCAT-3' SEQ ID NO.3
 Mẫu dò đột biến: 5'-CCGGGCCCTGCCAT-3' SEQ ID NO.4

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1A3243G, ĐC2A3243G, ĐC3A3243G, ĐC4A3243G bao gồm các plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và trình tự SEQ ID NO.6 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmit/ μ l, 5×10^4 plasmit/ μ l, 5×10^5 plasmit/ μ l và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến A3243G trên gen ty thể.

Thành phần ĐCA3243G là plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 nêu trong SEQ ID NO.5, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm A3243G trên gen ty thể của người.

Thành phần MXG3380A đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm G3380A, trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn mồi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Mồi xuôi: 5'-GGCCAACCTCCTACTCCTCAT-3'	SEQ ID NO.7
Mồi ngược: 5'-CCTACAACGTTGGGGCCTTTG-3'	SEQ ID NO.8
Mẫu dò không đột biến: 5'-ATTTTTCGTTTCGGT-3'	SEQ ID NO.9
Mẫu dò đột biến: 5'-ATTTTTCGTTTCGGT-3'	SEQ ID NO.10

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1G3380A, ĐC2G3380A, ĐC3G3380A, ĐC4G3380A bao gồm các plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và trình tự SEQ ID NO.12 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmit/ μ l, 5×10^4 plasmit/ μ l, 5×10^5 plasmit/ μ l và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến G3380A trên gen ty thể.

Thành phần ĐCG3380A là plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11 nêu trong SEQ ID NO.11, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm G3380A trên gen ty thể của người.

Thành phần MXA3844G đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm A3844G, trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn môi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Mỗi xuôi: 5'-AGCCCACTGTAAAGCTAAC-3' SEQ ID NO.13

Mỗi ngược: 5'-GGCATTTCACTGTAAAGAGGT-3' SEQ ID NO.14

Mẫu dò không đột biến: 5'-AGATTAAGAGAACC-3' SEQ ID NO.15

Mẫu dò đột biến: 5'-GATTAAGAGAGCC-3' SEQ ID NO.16

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3'. mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1A8344G, ĐC2A8344G, ĐC3A8344G, ĐC4A8344G bao gồm các plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.17 và trình tự SEQ ID NO.18 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmid/ μ l, 5×10^4 plasmid/ μ l, 5×10^5 plasmid/ μ l và 5×10^6 plasmid/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến A8344G trên gen ty thể.

Thành phần ĐCA8344G là plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.17 nêu trong SEQ ID NO.17, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm A8344G trên gen ty thể của người.

Thành phần MXT8993G đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm T8993G trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn môi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Mỗi xuôi: CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA SEQ ID NO.19

Mỗi ngược: CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG SEQ ID NO.20

Mẫu dò không đột biến: AATAGCCCTGGCC SEQ ID NO.21

Mẫu dò đột biến: AATAGCCCGGGCCGT SEQ ID NO.22

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1T8993G, ĐC2T8993G, ĐC3T8993G, ĐC4T8993G bao gồm các plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và trình tự SEQ ID NO.24 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmit/ μ l, 5×10^4 plasmit/ μ l, 5×10^5 plasmit/ μ l và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến T8993G trên gen ty thể.

Thành phần ĐC1T8993G chứa là plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 nêu trong SEQ ID NO.23, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm T8993G trên gen ty thể của người.

Thành phần MXT8993C đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm T8993C trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn môi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Mũi xuôi: CGAAACCATCAGCCTACTCATTC	SEQ ID NO.19
Mũi ngược: CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAG	SEQ ID NO.20
Mẫu dò không đột biến: AATAGCCCTGGCC	SEQ ID NO.21
Mẫu dò đột biến: ATAGCCCCGGCCGT	SEQ ID NO.25

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1T8993C, ĐC2T8993C, ĐC3T8993C, ĐC4T8993C bao gồm các plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và trình tự SEQ ID NO.26 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmit/ μ l, 5×10^4 plasmit/ μ l, 5×10^5 plasmit/ μ l và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến T8993C trên gen ty thể.

Thành phần ĐCT8993C chứa là plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 nêu trong SEQ ID NO.23, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm T8993C trên gen ty thể của người.

Theo một phương án ưu tiên, thành phần mỗi SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.21 là dùng chung cho hai đột biến T8993G và T8993C; cũng như đối chứng âm ĐCT8993G và ĐCT8993C là giống nhau giữa hai đột biến này.

Thành phần MXG11778A đóng vai trò là hỗn hợp phản ứng để xác định đột biến điểm G11778A trong đó chứa dung dịch đệm 2X, các dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza, các đoạn mồi và các mẫu dò không đột biến gắn đầu dò huỳnh quang HEX và mẫu dò đột biến gắn đầu dò huỳnh quang FAM, trong đó:

Mồi xuôi: CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC SEQ ID NO.27

Mồi ngược: GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC SEQ ID NO.28

Mẫu dò không đột biến: ATGATGCGACTGTG SEQ ID NO.29

Mẫu dò đột biến: ATGATGTGACTG SEQ ID NO.30

Các mẫu dò không đột biến được gắn 5HEX vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', mẫu dò đột biến được gắn 56FAM vào đầu 5' và 3IABkFQ vào đầu 3', vị trí in đậm của các mẫu dò thể hiện vị trí nucleotit dạng cầu khóa.

Các thành phần ĐC1G11778A, ĐC2G11778A, ĐC3G11778A, ĐC4G11778A bao gồm các plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và trình tự SEQ ID NO.32 được phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 với nồng độ thay đổi 5×10^3 plasmit/ μ l, 5×10^4 plasmit/ μ l, 5×10^5 plasmit/ μ l và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng với mỗi thành phần. Các thành phần này được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trong định lượng đột biến TG11778A trên gen ty thể.

Thành phần ĐCG11778A là plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 nêu trong SEQ ID NO.31, đóng vai trò làm thành phần đối chứng âm để đánh giá vị trí đột biến điểm TG11778A trên gen ty thể của người.

Các thành phần trong kit theo sáng chế được áp dụng cho 100 phản ứng PCR để xác định 6 đột biến điểm trên gen ty thể của người. Theo các phương án ưu tiên, lượng tổng của các thành phần có trong kit có thể thay đổi theo tỷ lệ tương ứng cho 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 200 phản ứng, nhưng các thành phần và tỷ lệ tương ứng giữa các thành phần là không đổi.

Theo một phương án ưu tiên, kit theo sáng chế còn chứa thêm 1,2 ml nước loại ion đã khử trùng và hướng dẫn sử dụng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo các mẫu đối chứng dương; b) tạo các mẫu đối chứng âm; c) tạo hỗn hợp phản ứng PCR; và d) tạo kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể.

Trong bước tạo các mẫu đối chứng dương, các mẫu đối chứng dương được sử dụng theo sáng chế là các mẫu ADN không mang các đột biến A3243G, G3380A, A8344G, T8993G, T8993C và G11778A trên gen ty thể được trộn với các mẫu ADN mang các đột biến theo tỷ lệ 1:1.

Để tạo ra các mẫu mang đột biến điểm và không mang đột biến điểm, tiến hành biến nạp lần lượt 11 plasmid pJET 1.2 tái tổ hợp lần lượt chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.23 (dùng chung cho hai đột biến T8993G và T8993C), SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.11 vào chủng *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc LB chứa 30 đến 70 μ g/ml ampicillin để thu chủng *E. coli* DH5 α chuyển gen, sau đó chủng *E. coli* DH5 α biến nạp được nuôi cấy thu tế bào.

Phương pháp biến nạp, sàng lọc chủng *E. coli* đột biến cũng như chiết tách plasmid được thực hiện chung như sau: lấy từ 30 đến 100 μ l tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bảo quản trong tủ lạnh sâu -80°C ra để trên nước đá từ 10 đến 30 phút cho tan dần, tiếp đó bổ sung từ 1 đến 5 μ l plasmid, trộn nhẹ và để trên nước đá từ 10 đến 30 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào. Tiến hành sốc nhiệt ở 42°C trong thời gian từ 30 đến 60 giây, tiếp đó chuyển ngay lên nước đá từ 2 đến 5 phút. Sau đó bổ sung từ 200 đến 500 μ l môi trường LB (Luria Bertani) lỏng vào hỗn hợp biến nạp. Mẫu sau đó được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ từ 35 đến 40°C trong thời gian từ 10 đến 20 phút và tiếp đến nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng, nhiệt độ từ 35 đến 40°C trong khoảng 60 phút. Từ 10 đến 100 μ l hỗn hợp biến nạp được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có từ 30 đến 70 μ g/ml ampicillin và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ từ 35 đến 40°C qua đêm.

Kết quả biến nạp sẽ thấy xuất hiện nhiều khuẩn lạc trắng, tiến hành tách plasmid theo kit tách thương mại, ví dụ của hãng Qiagen, plasmid sau tinh sạch được định lượng bằng máy nanodrop tại bước sóng 260 nm (A_{260}). Mỗi kết quả định lượng đã được lấy trung bình từ kết quả lặp lại 3 lần. Nồng độ plasmid sẽ được ứng dụng trong việc tính toán số bản sao mang đột biến và không mang đột biến. Đối với mỗi đột biến, pha loãng các mẫu plasmid sao cho mỗi mẫu có dải nồng độ plasmid từ 5×10^3 đến 5×10^6 bản sao, tiến hành trộn plasmid mang gen đột biến với plasmid mang gen không đột biến theo tỷ lệ 1:1 để tạo đối chứng dương có đột biến nhân tạo với tỷ lệ 50%. Kết quả bước này tạo ra 06 đối chứng dương là đột biến nhân tạo của lần lượt 6 đột biến trên với tỷ lệ 50%, mỗi đột biến có 4 mẫu đối chứng dương với nồng độ lần lượt 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 và 5×10^6 plasmid/ μ l.

Theo đó, khi phối trộn thu các mẫu đối chứng mang plasmid có gen đột biến và plasmid không mang đột biến cho mỗi nồng độ theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmid/ μ l)	Định lượng (μ l)	Tổng (μ l)
ĐC1 A3243G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^3	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^3	25	
ĐC2 A3243G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^4	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^4	25	
ĐC3 A3243G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^5	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^5	25	
ĐC4 A3243G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^6	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^6	25	
ĐC1 G3380A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^3	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^3	25	
ĐC2 G3380A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^4	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^4	25	
ĐC3 G3380A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^5	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^5	25	
ĐC4 G3380A	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^6	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^6	25	
ĐC1 A8344G	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^3	25	50
	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^3	25	
ĐC2	Plasmid chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^4	25	50

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmit/ μ l)	Định lượng (μ l)	Tổng (μ l)
A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^4	25	50
ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^5	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^5	25	50
ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^6	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^6	25	50
ĐC1 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^3	25	50
ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^4	25	50
ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^5	25	50
ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^6	25	50
ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^3	25	50
ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^4	25	50
ĐC3 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^5	25	50
ĐC4 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^6	25	50
ĐC1 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^3	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^3	25	50
ĐC2 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^4	25	
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^4	25	50
ĐC3 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^5	25	
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^5	25	50
ĐC4 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^6	25	
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^6	25	50

Kết quả tạo ra 24 mẫu đối chứng dương để sử dụng để xây dựng đường chuẩn nồng độ cho 6 điểm đột biến. Mỗi điểm đột biến có 4 mẫu với nồng độ 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng.

Trong bước tạo các mẫu đối chứng âm, đối chứng âm chính là các plasmit mang trình tự không đột biến tương ứng với các plasmit chứa các trình tự SEQ ID NO.5,

SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.31 đã được tạo ra trong các bước đầu của tạo các mẫu đối chứng dương với nồng độ của mỗi đối chứng âm là 4 pg/μl.

Cụ thể, tạo các mẫu đối chứng âm tương ứng theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (pg/μl)	Định lượng (μl)
ĐCA3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	4	200
ĐCG3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11	4	200
ĐCA8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	4	200
ĐCT8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCT8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCG11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	4	200

Trong bước tạo hỗn hợp phản ứng PCR, tiến hành tổng hợp các đoạn môi đặc hiệu, các đoạn dò gắn đầu dò huỳnh quang và các thành phần phản ứng PCR. Các kỹ thuật tổng hợp đoạn môi có thể thực hiện bằng phương pháp tổng hợp hóa học đã biết. các kỹ thuật gắn đầu dò huỳnh quang được thực hiện bằng kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các thành phần như dung dịch đệm TE, các dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP, UNG (uracil-N-glycosylase), Taq ADN polymeraza là các thành phần thương mại.

Các đoạn môi được tổng hợp và định lượng với hàm lượng như sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/μl)
1	CCACACCCACCCAAGAACAG	SEQ ID NO.1	10
2	AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT	SEQ ID NO.2	10
3	GGCCAACCTCCTACTCCTCAT	SEQ ID NO.7	10
4	CCTACAACGTTGGGGCCTTTG	SEQ ID NO.8	10
5	AGCCCACTGTAAAGCTAAC	SEQ ID NO.13	10
6	GGCATTTCACTGTAAAGAGGT	SEQ ID NO.14	10
7	CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA	SEQ ID NO.19	10
8	CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG	SEQ ID NO.20	10
9	CTGCCTAGCAAACCTCAAACACTAC	SEQ ID NO.27	10
10	GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC	SEQ ID NO.28	10

Theo một phương án ưu tiên, thành phần mỗi SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.20 cùng để nhân bản cho hai đột biến T8993G và T8993C.

Các mẫu dò được tổng hợp và gắn đầu dò huỳnh quang LNA để phát hiện 6 đột biến. Phản ứng sử dụng mẫu dò huỳnh quang Taqman có trình tự bổ sung với trình tự đặc hiệu trên ADN đích, đầu 5' của mẫu dò có gắn chất phát huỳnh quang (reporter) HEX (bước sóng kích thích/bước sóng phát ra là 535/556 nm) cho mẫu dò đặc hiệu với trình tự gen không có đột biến và FAM (bước sóng kích thích/bước sóng phát ra là 495/520 nm) cho mẫu dò đặc hiệu với trình tự gen có đột biến. Ngoài ra, để tăng nhiệt độ tách chuỗi (T_m) và tính đặc hiệu của mẫu dò, trong trình tự của mẫu dò còn có nucleotit cải biến dạng LNA. Vị trí của các nucleotit cải biến cho mỗi mẫu dò được đánh dấu bằng ký tự in đậm. Đầu 3' của mẫu dò có gắn chất hấp thụ tương ứng (quencher) là IBFQ (Iowa black fluorescence quencher). Phản ứng thực hiện dựa trên nguyên lý khi chưa có sự xuất hiện của sản phẩm khuếch đại đặc hiệu từ ADN đích thì mẫu dò Taqman vẫn còn nguyên vẹn nên huỳnh quang phát ra từ chất chỉ thị sẽ bị IBFQ hấp thụ. Khi bắt đầu có sự xuất hiện sản phẩm khuếch đại đặc hiệu thì mẫu dò Taqman sẽ bắt cặp với khuôn và bị enzym Taq ADN polymeraza cắt bỏ để kéo dài mỗi tổng hợp sợi bổ sung, do vậy chất chỉ thị sẽ tách ra khỏi chất hấp thụ và phát huỳnh quang khi nhận nguồn sáng kích thích. Sản phẩm khuếch đại càng nhiều thì số lượng chất chỉ thị tự do càng nhiều và cường độ huỳnh quang phát ra càng lớn và máy sẽ ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang. Các đoạn dò được tổng hợp hóa học, định lượng và gắn đầu dò huỳnh quang theo bảng sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/ μ l)	Đầu dò huỳnh quang
1	CCGGGCTCTGCCAT	SEQ ID NO.3	2	HEX
2	CCGGGCCCTGCCAT	SEQ ID NO.4	2	FAM
3	ATTTTTCGTTCCGT	SEQ ID NO.9	2	HEX
4	ATTTTTTGTTCGGT	SEQ ID NO.10	2	FAM
5	AGATTAAGAGAACC	SEQ ID NO.15	2	HEX
6	GATTAAGAGAGCC	SEQ ID NO.16	2	FAM
7	AATAGCCCTGGCC	SEQ ID NO.21	2	HEX
8	AATAGCCCGGGCCGT	SEQ ID NO.22	2	FAM
9	ATAGCCCCGGCCGT	SEQ ID NO.25	2	FAM
10	ATGATGCGACTGTG	SEQ ID NO.29	2	HEX
11	ATGATGTGACTG	SEQ ID NO.30	2	FAM

Kết quả thu được 11 mẫu dò tương ứng cho 6 trường hợp đột biến và không đột biến, sau đó phối trộn thu hỗn hợp phản ứng theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	Môi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Môi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
	Môi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	

Trong bước tạo kit, tổng số 36 thành phần sản xuất được ở trên được đóng vào các ống nhỏ, tiếp đó được đóng gói theo các nhóm như sau để thu kit:

stt	Ký hiệu	Số lượng (ống)	Nhóm
1	MXA3243G	1	1 Xác định đột biến điểm A3243G
2	ĐC1A3243G	1	
3	ĐC2A3243G	1	
4	ĐC3A3243G	1	
5	ĐC4A3243G	1	
6	ĐCA3243G	1	
7	MXG3380A	1	2 Xác định đột biến điểm G3380A
8	ĐC1G3380A	1	
9	ĐC2G3380A	1	
10	ĐC3G3380A	1	
11	ĐC4G3380A	1	
12	ĐCG3380A	1	
13	MXA8344G	1	3 Xác định đột biến điểm A8344G
14	ĐC1A8344G	1	
15	ĐC2A8344G	1	
16	ĐC3A8344G	1	
17	ĐC4A8344G	1	
18	ĐCA8344G	1	

stt	Ký hiệu	Số lượng (ống)	Nhóm
19	MXT8993G	1	4 Xác định đột biến điểm T8993G
20	ĐC1T8993G	1	
21	ĐC2T8993G	1	
22	ĐC3T8993G	1	
23	ĐC4T8993G	1	
24	ĐCT8993G	1	
25	MXT8993C	1	5 Xác định đột biến điểm T8993C
26	ĐC1T8993C	1	
27	ĐC2T8993C	1	
28	ĐC3T8993C	1	
29	ĐC4T8993C	1	
30	ĐCT8993C	1	
31	MXG11778A	1	6 Xác định đột biến điểm G11778A.
32	ĐC1G11778A	1	
33	ĐC2G11778A	1	
34	ĐC3G11778A	1	
35	ĐC4G11778A	1	
36	ĐCG11778A	1	

Kit theo sáng chế có thể còn chứa 1,2 ml nước loại ion đã được khử trùng và hướng dẫn sử dụng. Theo đó, kit theo sáng chế có khả năng phát hiện được đồng thời 6 đột biến điểm trên gen ty thể của người trong cùng một điều kiện thực hiện.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tạo kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể

Tạo mẫu đối chứng dương

Sử dụng chủng *E. coli* DH5 α khả biến (Invitrogen) để biến nạp và 11 loại plasmit pJET1.2 đã được chèn từng đoạn gen ty thể của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.23 (dùng chung cho hai đột biến T8993G và T8993C), SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.31 và SEQ ID NO.32. Các plasmit này được tạo ra theo quy trình đã được đăng ký trong giải pháp hữu ích chấp nhận đơn số 66686/QĐSHTT ngày 23 tháng 10 năm 2015 và hiện mẫu *E. coli* chứa plasmit này được lưu giữ tại Phòng Protein tái tổ hợp, Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ

enym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội.

Tiến hành biến nạp riêng rẽ 11 plasmit pJET1.2 nêu trên vào chủng *E. coli* DH5α bằng cách hoạt hóa chủng *E. coli* DH5α và bổ sung từ 1 đến 1,5μl plasmit, trộn đều trên nước đá từ 10 đến 30 phút tạo điều kiện cho vector bám lên thành tế bào. Tiến hành sốc nhiệt ở 42°C trong thời gian từ 30 đến 60 giây, tiếp đó chuyển ngay lên nước đá từ 2 đến 5 phút. Sau đó bổ sung từ 200 đến 500 μl môi trường LB (Luria Bertani) lỏng vào hỗn hợp biến nạp. Mẫu sau đó được nuôi cấy tĩnh trong tủ ấm ở nhiệt độ từ 35 đến 40°C trong thời gian từ 10 đến 20 phút và tiếp đến nuôi lắc ở tốc độ 150 vòng, nhiệt độ từ 35 đến 40°C trong khoảng 60 phút. Từ 10 đến 100 μl hỗn hợp biến nạp được cấy trải tế bào trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc có từ 30 đến 70 μg/ml ampicilin và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ từ 35 đến 40°C qua đêm.

Thu nhận khuẩn lạc trắng và tiến hành tách plasmit bằng kit tách thương mại của Qiagen. Plasmit sau tinh sạch được định lượng bằng máy nanodrop tại bước sóng 260 nm (A_{260}). Nồng độ plasmit được định lượng số bản sao mang đột biến và không mang đột biến.

Kết quả, đối với đột biến A3243G: tinh sạch được 02 mẫu plasmit gồm 01 plasmit mang gen có đột biến A3243G và 01 plasmit mang gen không có đột biến này với nồng độ plasmit tương ứng là 35,7 ng/μl và 42,5 ng/μl. Tiếp theo dựa trên công thức tính số bản sao của plasmit sau:

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

Trong đó C (ng/μl) là nồng độ của plasmit, L (bp) là chiều dài của vector pJET1.2 tái tổ hợp mang đoạn gen có và không có đột biến A3243G (3292 bp).

Theo công thức trên plasmit mang đoạn gen đột biến A3243G có số bản sao là 1×10^{10} bản sao/μl và plasmit mang gen không có đột biến A3243G có số bản sao là $1,2 \times 10^{10}$. Các plasmit này được pha loãng về thành 04 nồng độ $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^5$ và $5 \cdot 10^6$, tiếp theo tại mỗi nồng độ lấy 25 μl plasmit mang đoạn gen đột biến A3243G trộn với 25 μl plasmit mang đoạn gen không có đột biến A3243G tạo thành 50 μl

ADN đối chứng dương của đột biến A3243G với tỷ lệ 50% đột biến. Đối với 05 đối chứng dương của 05 đột biến còn lại, tiến hành tương tự.

Kết quả phối trộn thu được 24 mẫu đối chứng dương, mỗi mẫu 50 μ l. Các mẫu đối chứng dương này để sử dụng để xây dựng đường chuẩn nồng độ cho 6 điểm đột biến. Mỗi điểm đột biến có 4 mẫu với nồng độ 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 và 5×10^6 plasmit/ μ l, tương ứng. Các mẫu này được cho vào từng lọ nhỏ và được đánh dấu theo thứ tự ĐC1A3243G, ĐC2A3243G, ĐC3A3243G, ĐC4A3243G, ĐC1A3243G, ĐC2G3380A, ĐC3G3380A, ĐC4G3380A, ĐC1A8344G, ĐC2A8344G, ĐC3A8344G, ĐC4A8344G, ĐC1T8993G, ĐC2T8993G, ĐC3T8993G, ĐC4T8993G, ĐC1T8993C, ĐC2T8993C, ĐC3T8993C, ĐC4T8993C, ĐC1G11778A, ĐC2G11778A, ĐC3G11778A và ĐC4G11778A.

Tạo mẫu đối chứng âm

Đối chứng âm chính là các plasmit mang trình tự không đột biến tương ứng với các plasmit chứa các trình tự SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.31 đã được tạo ra trong các bước đầu của tạo các mẫu đối chứng dương.

Tiếp theo, định lượng plasmit sau tinh sạch bằng máy nanodrop tại bước sóng 260 nm (A_{260}); đưa về nồng độ 2 pmol/ μ l và chia thành 6 mẫu đối chứng âm, mỗi mẫu 200 μ l. Các mẫu này được cho vào ống eppendorf và đánh dấu tương ứng ĐCA3243G, ĐCG3380A, ĐCA8344G, ĐCT8993G, ĐCT8993C và ĐCG11778A

Tổng hợp đoạn mồi và đoạn dò đặc hiệu

Các đoạn mồi đặc hiệu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.19 (dùng chung cho hai đột biến T8993G và T8993C), SEQ ID NO.20 (dùng chung cho hai đột biến T8993G và T8993C), SEQ ID NO.27 và SEQ ID NO.28, (10 mồi) được Invitrogen tổng hợp bằng phương pháp hóa học. Các thành phần bao gồm dung dịch đệm TE, các dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP, UNG (uracil-N-glycosylase), Taq ADN polymeraza là các thành phần thương mại của hãng Invitrogen hoặc Enzymomics.

stt	Trình tự	Số trình tự	Tm (°C)
1	CCACACCCACCCAAGAACAG	SEQ ID NO.1	68,4

stt	Trình tự	Số trình tự	T _m (°C)
2	AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT	SEQ ID NO.2	56,7
3	GGCCAACCTCCTACTCCTCAT	SEQ ID NO.7	60,9
4	CCTACAACGTTGGGGCCTTTG	SEQ ID NO.8	61,7
5	AGCCCACTGTAAAGCTAAC	SEQ ID NO.13	60,1
6	GGCATTTTCACTGTAAAGAGGT	SEQ ID NO.14	61,1
7	CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA	SEQ ID NO.19	65,1
8	CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG	SEQ ID NO.20	65,0
9	CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC	SEQ ID NO.27	60,4
10	GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC	SEQ ID NO.28	60,2

Các mẫu dò được tổng hợp và gắn đầu dò huỳnh quang LNA để phát hiện 6 đột biến. Các đầu dò được gắn chất phát huỳnh quang (chất chỉ thị) HEX đối với trình tự không đột biến và FAM đối với trình tự đột biến tại đầu 5', đầu 3' được gắn chất hấp thụ IBFQ (Iowa black fluorescence quencher). Kết quả Các đoạn dò được tổng hợp hóa học, định lượng và gắn đầu dò huỳnh quang như sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	T _m (°C)
1	5'-/5HEX/CCGGGCTCTGCCAT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.3	58,4
2	5'-/56FAM/CCGGGCCCTGCCAT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.4	56,7
3	5'-/5HEX/ATTTTTCGTTCTGGT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.9	65,1
4	5'-/56FAM/ATTTTTCGTTCTGGT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.10	63,4
5	5'-/5HEX/AGATTAAGAGAACC/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.15	61,1
6	5'-/56FAM/GATTAAGAGAGCC/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.16	61,1
7	5'-/5HEX/AATAGCCCTGGCC/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.21	67,2
8	5'-/56FAM/AATAGCCCGGGCCGT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.22	65,3
10	5'-/56FAM/ATAGCCCCGGGCCGT/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.25	66,0
11	5'-/5HEX/ATGATGCGACTGTG/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.29	65,7
12	5'-/56FAM/ATGATGTGACTG/3IABkFQ/-3'	SEQ ID NO.30	64,6

(các ký tự đậm chỉ nucleotit dạng cầu khóa LNA)

Phối trộn tạo hỗn hợp phản ứng

Các thành phần bao gồm đoạn mồi, đoạn dò được phối trộn với dung dịch đệm chứa 2X dNTP dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dUTP, UNG (uracil-N-glycosylase), Taq ADN polymeraza (Invitrogen hoặc enzymomics) theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2	100	

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	pmol/μl		
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Môi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
	Môi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	

Tạo kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể

Tiến hành đóng gói tổng số 36 thành phần được sản xuất như nêu trên theo các nhóm sau để thu kit để xác định 6 điểm đột biến điểm trên gen ty thể hoàn chỉnh:

stt	Ký hiệu	Số lượng (ống)	Nhóm
1	MXA3243G	1	1 Xác định đột biến điểm A3243G
2	ĐC1A3243G	1	
3	ĐC2A3243G	1	
4	ĐC3A3243G	1	
5	ĐC4A3243G	1	
6	ĐCA3243G	1	
7	MXG3380A	1	2 Xác định đột biến điểm G3380A
8	ĐC1G3380A	1	
9	ĐC2G3380A	1	
10	ĐC3G3380A	1	
11	ĐC4G3380A	1	
12	ĐCG3380A	1	
13	MXA8344G	1	3 Xác định đột biến điểm A8344G
14	ĐC1A8344G	1	
15	ĐC2A8344G	1	
16	ĐC3A8344G	1	
17	ĐC4A8344G	1	
18	ĐCA8344G	1	
19	MXT8993G	1	4

stt	Ký hiệu	Số lượng (ống)	Nhóm
20	ĐC1T8993G	1	Xác định đột biến điểm T8993G
21	ĐC2T8993G	1	
22	ĐC3T8993G	1	
23	ĐC4T8993G	1	
24	ĐCT8993G	1	
25	MXT8993C	1	5 Xác định đột biến điểm T8993C
26	ĐC1T8993C	1	
27	ĐC2T8993C	1	
28	ĐC3T8993C	1	
29	ĐC4T8993C	1	
30	ĐCT8993C	1	
31	MXG11778A	1	6 Xác định đột biến điểm G11778A.
32	ĐC1G11778A	1	
33	ĐC2G11778A	1	
34	ĐC3G11778A	1	
35	ĐC4G11778A	1	
36	ĐCG11778A	1	

Ví dụ 2. Xác định khả năng phát hiện đột biến và thiết lập đường chuẩn

Để xác định khả năng nhận bản các đoạn gen ty thể đặc hiệu của vùng chứa đột biến tương ứng bằng cách kiểm tra đường chuẩn thể hiện tương quan tỷ lệ nghịch giữa C_t và logarit số bản sao gen ty thể chứa và không chứa đột biến A3243G, G3380A, A8344G, T8993G, T8993C và G11778A, tiến hành sử dụng khuôn là các đối chứng dương với dải 4 nồng độ từ 5×10^3 đến 5×10^6 có tỷ lệ đột biến 50% theo kit được sản xuất trong Ví dụ 1.

Tiến hành real-time PCR đối với từng đột biến với thành phần phản ứng theo bảng sau:

Thành phần	Thể tích một phản ứng (μ l)
Hỗn hợp phản ứng cho real-time PCR	15
Đối chứng dương (4 nồng độ từ 5×10^3 - 5×10^6 cho 4 phản ứng)	5
Tổng thể tích cuối cùng	20

Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện trong một chu kỳ với 50°C trong 4 phút, 95°C trong 10 phút để biến tính ban đầu, 40 chu kỳ với biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mỗi và kéo dài chuỗi ở 60°C trong 30 giây.

Phân tích kết quả: Sau khi hoàn tất các chu kỳ nhiệt, các mẫu chuẩn có các đường biểu diễn khuếch đại tương ứng. Từ giá trị ngưỡng (C_t) của mẫu chuẩn biểu đồ mối liên hệ giữa chu kỳ ngưỡng và số bản sao ban đầu được xây dựng. Cụ thể, kết quả là tin cậy khi hiệu suất E của real-time PCR nằm trong khoảng 85 đến 110%, hệ số tương quan $R > 0,97$. Dựa vào đường chuẩn sẽ tính được số bản sao của mẫu phân tích và tỷ lệ đột biến được tính toán dựa trên công thức:

$$\% \text{ Đột biến} = \frac{A_{\text{FAM}}}{A_{\text{FAM}} + B_{\text{HEX}}}$$

Trong đó: A_{FAM} là số bản sao đột biến (kênh FAM)

B_{HEX} : là số bản sao không đột biến (kênh HEX)

Kết quả đối với đột biến A3243G cho thấy hiệu suất PCR nằm trong khoảng 89-105%. Hệ số tương quan tuyến tính của hai kênh đột biến (FAM) và không đột biến (HEX) lần lượt bằng 1,000 và 0,998 (Hình 1); số chu kỳ (C_t) tại mỗi nồng độ của mỗi đột biến trên kênh HEX là gần tương tự như kênh FAM, chứng tỏ đường chuẩn được thiết lập có độ tuyến tính cao với 2 kênh đột biến và không đột biến, cho thấy sự tin cậy trong việc định lượng đột biến A3243G.

Các mẫu khác được tiến hành như trên và cho kết quả tương tự.

Ví dụ 3. Xác định độ đặc hiệu của kit theo sáng chế

Để tiến hành xác định độ đặc hiệu của phản ứng phát hiện đột biến của kit thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm với từng đột biến.

Đối với đột biến xác định A3243G, tiến hành sử dụng các khuôn sau cho real-time PCR: khuôn 1 là hỗn hợp 6 mẫu ADN tổng số tinh sạch từ 6 mẫu bệnh phẩm không mang đột biến A3243G (đã được xác định trước đó bằng PCR-RFLP và đọc trình tự); khuôn 2 là hỗn hợp các plasmid pJET1.2 mang gen có nucleotit tại vị trí 3380 là G (ký hiệu 3380G) cùng với 3380A, 8344A, 8344G, 11778A, 11778G, 8993T, 8993G và 8993C; khuôn 3 là ADN tổng số tinh sạch từ huyết thanh của bệnh nhân mang đột biến A3243G ở dạng không đồng nhất.

Thành phần phản ứng bao gồm: 15 μ l Master mix; 2 μ l DNA khuôn và 3 μ l H₂O.

Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện trong 1 chu kì với 50°C trong 4 phút, 95°C trong 10 phút để biến tính, 40 chu kì với biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mồi và kéo dài chuỗi ở 60°C trong 30 giây.

Kết quả Hình 2 cho thấy khi sử dụng khuôn 1 chỉ thu được tín hiệu kênh không đột biến (HEX) và không thu được tín hiệu của kênh đột biến (FAM); chứng tỏ kit đặc hiệu 100% với mẫu âm tính. Trong khi đó, với khuôn 2, không thu được tín hiệu của cả hai kênh đột biến và không đột biến do khuôn không mang ADN đột biến A3243G và hỗn hợp phản ứng lại chứa mẫu dò cho đột biến này do vậy không thu được tín hiệu dù khuôn có mang các đột biến khác (Hình 3). Ngược lại với khuôn 3 là mẫu ADN dương tính ở dạng không đồng nhất nên thu được tín hiệu ở cả hai kênh đột biến và không đột biến. Điều này chứng tỏ rằng kit theo sáng chế không có khả năng bắt cặp chéo giữa các đột biến khác nhau, đồng thời đặc hiệu 100% với các mẫu bệnh phẩm có mang đột biến A3243G.

Các đột biến còn lại làm tương tự như đột biến A3243G và cho kết quả đặc hiệu 100%.

Ví dụ 4. Xác định độ nhạy của kit theo sáng chế

Tiến hành xác định độ nhạy của kit thu được từ Ví dụ 1, sử dụng khuôn là các đối chứng dương với tỷ lệ đột biến là 1% (được tạo ra do trộn plasmit mang đột biến gen với plasmit không mang đột biến gen theo tỷ lệ 1:99) của các đột biến A3243G, G3380A, A8344G, G11778A, T8993G, T8993C. Thành phần phản ứng bao gồm: hỗn hợp phản ứng cho real-time PCR: 15 μ l, ADN khuôn 5 μ l. Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện với 2 bước: 1 chu kì với 50°C trong 4 phút, 95°C trong 10 phút để biến tính, và 40 chu kì với các bước biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mồi và kéo dài chuỗi ở 60°C trong 30 giây.

Kết quả, biểu đồ đường cong khuếch đại sau khi kết thúc real-time PCR (Hình 4) cho thấy sử dụng ADN khuôn có đột biến A3243G với tỉ lệ 1%, thu được tín hiệu của cả hai kênh đột biến (FAM) và không đột biến (HEX), chứng tỏ kit có thể phát hiện từ 1% tỷ lệ đột biến A3243G trong mẫu cần phân tích. Đối với các đột biến còn lại cũng cho kết quả tương tự. Qua đó khẳng định, kit real-time PCR sử dụng mẫu dò huỳnh

quang nucleotit dạng cầu khóa (LNA) nhằm phát hiện và định lượng một số đột biến gen ty thể phổ biến có thể phát hiện đột biến với độ nhạy từ 1%.

Ví dụ 5. Xác định thời gian bảo quản của kit theo sáng chế

Để xác định thời gian bảo quản của kit thu được từ Ví dụ 1, các hỗn hợp phản ứng cho real-time PCR được bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày; tại 4°C trong 14 ngày, 20 ngày và 1 tháng và tại -20°C trong 3 tháng và 6 tháng. Sau đó sử dụng các mẫu chuẩn với nồng độ từ 5×10^3 đến 5×10^6 làm khuôn, xây dựng đường chuẩn và đánh giá chất lượng kit sau thời gian bảo quản.

Kết quả phân tích đột biến bằng real-time PCR sử dụng kit đã được bảo quản 7 ngày ở nhiệt độ phòng (Hình 5) cho thấy kit vẫn hoạt động tốt, thể hiện ở các biểu đồ đường cong khuếch đại của 6 đột biến vẫn cho tín hiệu ổn định, hệ số tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng và số bản sao ban đầu của 2 kênh đột biến và không đột biến của các mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,99 chứng tỏ rằng đường chuẩn có giá trị tin cậy khi định lượng đột biến đồng thời cũng chỉ ra rằng kit sau 7 ngày vẫn hoạt động tốt.

Kết quả phân tích đột biến bằng real-time PCR sử dụng kit đã được bảo quản 20 ngày ở 4°C (Hình 6) cho thấy kit vẫn hoạt động tốt, thể hiện ở các biểu đồ đường cong khuếch đại của các đột biến vẫn cho tín hiệu ổn định, hệ số tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng và số bản sao ban đầu của 2 kênh đột biến và không đột biến của các mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,99.

Kết quả phân tích đột biến bằng real-time PCR sử dụng kit đã được bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong thời gian 6 tháng (Hình 7) cho thấy biểu đồ đường cong khuếch đại của các đột biến vẫn cho tín hiệu ổn định, hệ số tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng và số bản sao ban đầu của 2 kênh đột biến và không đột biến của các mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,99. Như vậy, sau 6 tháng bảo quản ở -20°C kit vẫn còn hoạt động tốt, có độ tin cậy khi phát hiện và định lượng đột biến gen ty thể.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kit theo sáng chế cho phép chuẩn hóa điều kiện chạy PCR để phát hiện và định lượng cả sáu đột biến điểm A3243G, G3380A, A8344G, T8993C, T8993G và G11778A trên gen ty thể, cho phép chạy real-time PCR để phát hiện cả 6 đột biến này trong cùng một điều kiện, giúp giảm chi phí xét nghiệm cũng như tăng hiệu quả, tránh

được việc sai sót, nhằm lẫn trong việc thiết lập điều kiện real-time PCR trong xét nghiệm.

Kit theo sáng chế cho phép xác định được các đột biến liên quan đến các bệnh di truyền, cụ thể là phát hiện cả 6 đột biến này để sàng lọc các hội chứng MELAS, Leigh, MERRF, LHON trong một kit duy nhất, mở hướng cho phân tích, sàng lọc bệnh học một cách hiệu quả.

Kit theo sáng chế được thiết kế với đối chứng âm, đối chứng dương đặc hiệu cùng với các đoạn mồi, đoạn dò cho phép phát hiện và định lượng được từng đột biến với tỷ lệ đột biến tới 1%, ngoài ra, bằng cách sử dụng các plasmit, kit cho phép bảo quản và sử dụng trong thời gian dài.

Quy trình sản xuất kit theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện, bằng các kết hợp kỹ thuật di truyền, sử dụng các chủng vi khuẩn khả biến và các plasmit thể hệ mới cho giúp dễ dàng phân lập, tinh sạch và tạo kit với hiệu suất cao với khả năng ổn định lâu dài.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể, trong đó kit này bao gồm:

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (µl)	Tổng (µl)
1	MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/µl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/µl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/µl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/µl	100	
		Đệm TE	100	
2	ĐC1 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	50	50
3	ĐC2 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/µl	50	50
4	ĐC3 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/µl	50	50
5	ĐC4 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/µl	50	50
6	ĐC A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5, nồng độ 4 pg/µl	200	200
7	MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/µl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/µl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/µl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/µl	100	
		Đệm TE	100	
8	ĐC1 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/µl	50	50
9	ĐC2 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/µl	50	50

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
10	ĐC3 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
11	ĐC4 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
12	ĐC G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11, nồng độ 4 pg/μl	200	200
13	MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
14	ĐC1 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
15	ĐC2 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
16	ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.19 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.20 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/ml	50	50
17	ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
18	ĐC A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17, nồng độ 4 pg/μl	200	200
19	MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Mồi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Mồi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2 pmol/μl	100	
		Đệm TE	100	
20	ĐC1	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ	50	50

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	T8993G	độ 5×10^3 plasmit/μl		
21	ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
22	ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
23	ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
24	ĐC T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200
25	MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2 pmo/μl	100	
		Đệm TE	100	
26	ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
27	ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
28	ĐC3 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
29	ĐC4 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
30	ĐC T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23, nồng độ 4 pg/μl	200	200
31	MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
		Môi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
		Môi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
		Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	

stt	Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
		Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	10	
		Đệm TE	100	
32	ĐC1 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^3 plasmit/μl	50	50
33	ĐC2 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^4 plasmit/μl	50	50
34	ĐC3 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^5 plasmit/μl	50	50
35	ĐC4 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31 và plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32 theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 5×10^6 plasmit/μl	50	50
36	ĐC G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31, nồng độ 4 pg/μl	200	200.

2. Kit theo điểm 1, trong đó kit này còn chứa thêm 1,2 ml nước loại ion đã khử trùng và hướng dẫn sử dụng.

3. Quy trình sản xuất kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo các mẫu đối chứng dương:

- biến nạp riêng rẽ 11 plasmit pJET 1.2 tái tổ hợp lần lượt chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.31 và SEQ ID NO.32 vào chủng *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc LB chứa 30 đến 70 μg/ml ampicilin để thu chủng *E. coli* DH5α chuyển gen, sau đó chủng *E. coli* DH5α biến nạp được nuôi cấy thu tế bào;

- chuẩn hóa lượng plasmit bằng cách chiết plasmit ra khỏi tế bào *E. coli* DH5α biến nạp, tiếp đến định lượng plasmit cho mỗi mẫu với nồng độ $5 \cdot 10^3$, 5×10^4 , 5×10^5 và 5×10^6 plasmit/μl;

- phối trộn thu các mẫu đối chứng bằng cách phối trộn plasmit mang gen đột biến và plasmit không mang đột biến cho mỗi nồng độ theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmit/ μ l)	Thể tích (μ l)	Tổng (μ l)
ĐC1 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^3	25	
ĐC2 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^4	25	
ĐC3 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^5	25	
ĐC4 A3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.6	5×10^6	25	
ĐC1 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.12	5×10^3	25	
ĐC2 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^4	25	
ĐC3 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^5	25	
ĐC4 G3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 11	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO. 12	5×10^6	25	
ĐC1 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^3	25	
ĐC2 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^4	25	
ĐC3 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^5	25	
ĐC4 A8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.18	5×10^6	25	
ĐC1 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^3	25	
ĐC2 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^4	25	
ĐC3 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^5	25	
ĐC4 T8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.24	5×10^6	25	

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (plasmit/ μ l)	Thể tích (μ l)	Tổng (μ l)
ĐC1 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^3	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^3	25	
ĐC2 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^4	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^4	25	
ĐC3 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^5	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^5	25	
ĐC4 T8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	5×10^6	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.26	5×10^6	25	
ĐC1 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^3	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^3	25	
ĐC2 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^4	25	50
	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^4	25	
ĐC3 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^5	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^5	25	
ĐC4 G11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	5×10^6	25	50
	plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.32	5×10^6	25	

b) tạo các mẫu đối chứng âm:

- Định lượng plasmit tương ứng chứa trình tự SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.31 đã được tạo ra ở bước a) đến nồng độ 2 pmol/ μ l;

- Tạo các mẫu đối chứng âm tương ứng theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần	Nồng độ (pg/ μ l)	Định lượng (μ l)
ĐCA3243G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.5	4	200
ĐCG3380A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.11	4	200
ĐCA8344G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.17	4	200
ĐCT8993G	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCT8993C	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.23	4	200
ĐCG11778A	Plasmit chứa trình tự SEQ ID NO.31	4	200

c) Tạo hỗn hợp phản ứng PCR:

- Tạo các đoạn mồi bằng cách tổng hợp và định lượng trình tự nucleotit có trình tự nêu trong bảng sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/μl)
1	CCACACCCACCCAAGAACAG	SEQ ID NO.1	10
2	AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT	SEQ ID NO.2	10
3	GGCCAACCTCCTACTCCTCAT	SEQ ID NO.7	10
4	CCTACAACGTTGGGGCCTTTG	SEQ ID NO.8	10
5	AGCCCACTGTAAAGCTAAC	SEQ ID NO.13	10
6	GGCATTTTCACTGTAAAGAGGT	SEQ ID NO.14	10
7	CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA	SEQ ID NO.19	10
8	CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG	SEQ ID NO.20	10
9	CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC	SEQ ID NO.27	10
10	GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC	SEQ ID NO.28	10

- Tạo các đoạn dò bằng cách tổng hợp, định lượng và gắn đầu dò huỳnh quang theo bảng sau:

stt	Trình tự	Số trình tự	Nồng độ (pmol/μl)	Đầu dò huỳnh quang
1	CCGGGCTCTGCCAT	SEQ ID NO.3	2	HEX
2	CCGGGCCCTGCCAT	SEQ ID NO.4	2	FAM
3	ATTTTTCGTTCCGT	SEQ ID NO.9	2	HEX
4	ATTTTTTGTTCGGT	SEQ ID NO.10	2	FAM
5	AGATTAAGAGAACC	SEQ ID NO.15	2	HEX
6	GATTAAGAGAGCC	SEQ ID NO.16	2	FAM
7	AATAGCCCTGGCC	SEQ ID NO.21	2	HEX
8	AATAGCCCGGGCCGT	SEQ ID NO.22	2	FAM
9	ATAGCCCCGGCCGT	SEQ ID NO.25	2	FAM
10	ATGATGCGACTGTG	SEQ ID NO.29	2	HEX
11	ATGATGTGACTG	SEQ ID NO.30	2	FAM

- phối trộn thu hỗn hợp phản ứng theo từng thành phần theo bảng sau:

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
MX A3243G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.1, 10 pmol/μl	100	

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.2, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.3, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.4, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX G3380A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.7, 10 pmol/μl	100	
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.8, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.9, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.10, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX A8344G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.13, 10 pmol/μl	100	
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.14, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.15, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.16, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993G	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.22, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	
MX T8993C	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mỗi xuôi: SEQ ID NO.19, 10 pmol/μl	100	
	Mỗi ngược: SEQ ID NO.20, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.21, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.25, 2pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	

Ký hiệu	Thành phần, hàm lượng	Thể tích (μl)	Tổng (μl)
MX G11778A	Dung dịch đệm 2X chứa dNTP, dUTP, UNG, Taq ADN polymeraza	1000	1500
	Mồi xuôi: SEQ ID NO.27, 10 pmol/μl	100	
	Mồi ngược: SEQ ID NO.28, 10 pmol/μl	100	
	Mẫu dò đột biến: SEQ ID NO.29, 2 pmol/μl	100	
	Mẫu dò không đột biến: SEQ ID NO.30, 2 pmol/μl	100	
	Đệm TE	100	

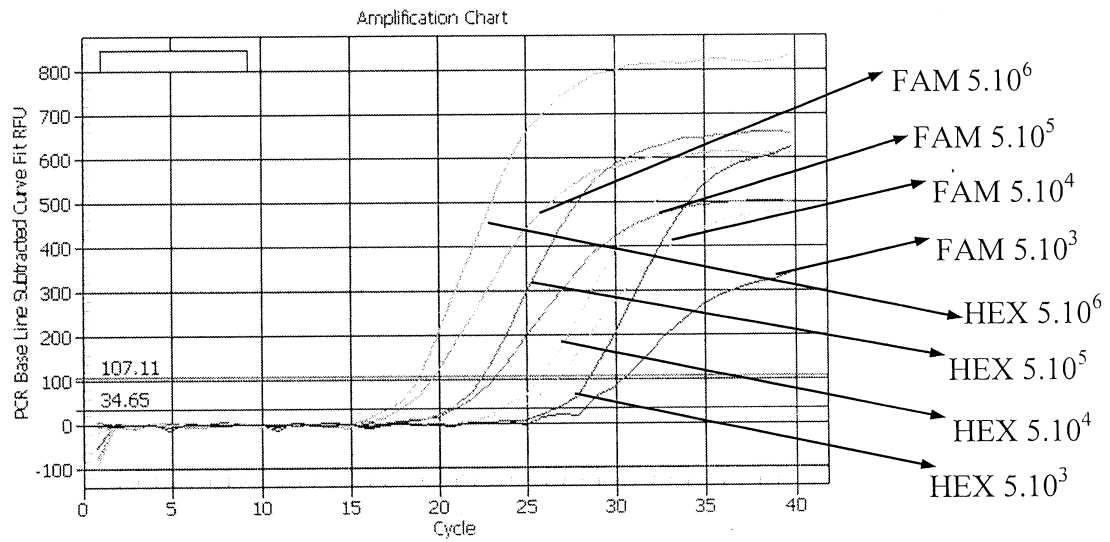
d) Tạo kit bằng cách đóng gói các thành phần được chuẩn bị từ bước a) đến bước c) theo các nhóm như sau:

stt	Ký hiệu	Số lượng(ống)	Nhóm
1	MXA3243G	1	1 Xác định đột biến điểm A3243G
2	ĐC1A3243G	1	
3	ĐC2A3243G	1	
4	ĐC3A3243G	1	
5	ĐC4A3243G	1	
6	ĐCA3243G	1	
7	MXG3380A	1	2 Xác định đột biến điểm G3380A
8	ĐC1G3380A	1	
9	ĐC2G3380A	1	
10	ĐC3G3380A	1	
11	ĐC4G3380A	1	
12	ĐCG3380A	1	
13	MXA8344G	1	3 Xác định đột biến điểm A8344G
14	ĐC1A8344G	1	
15	ĐC2A8344G	1	
16	ĐC3A8344G	1	
17	ĐC4A8344G	1	
18	ĐCA8344G	1	
19	MXT8993G	1	4 Xác định đột biến điểm T8993G
20	ĐC1T8993G	1	
21	ĐC2T8993G	1	
22	ĐC3T8993G	1	
23	ĐC4T8993G	1	

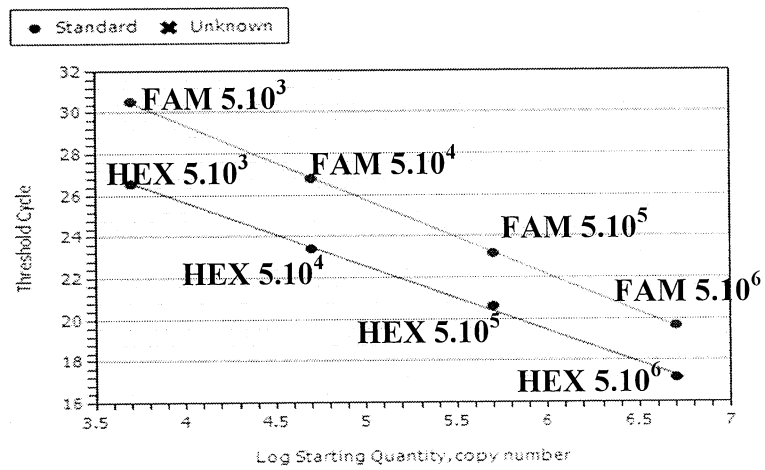
stt	Ký hiệu	Số lượng(ống)	Nhóm
24	ĐCT8993G	1	5 Xác định đột biến điểm T8993C
25	MXT8993C	1	
26	ĐC1T8993C	1	
27	ĐC2T8993C	1	
28	ĐC3T8993C	1	
29	ĐC4T8993C	1	
30	ĐCT8993C	1	
31	MXG11778A	1	6 Xác định đột biến điểm G11778A
32	ĐC1G11778A	1	
33	ĐC2G11778A	1	
34	ĐC3G11778A	1	
35	ĐC4G11778A	1	
36	ĐCG11778A	1	

HÌNH 1

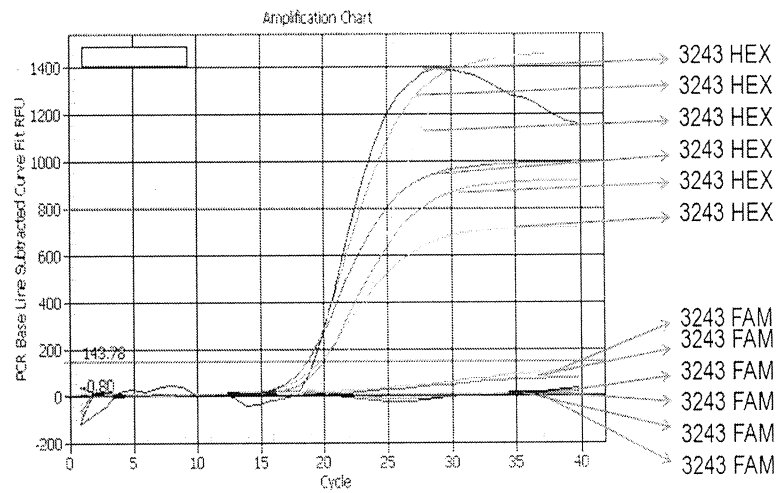
1A



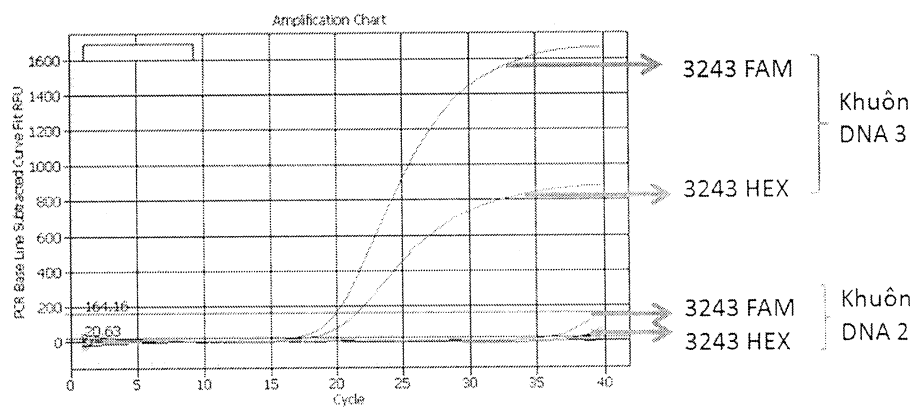
1B



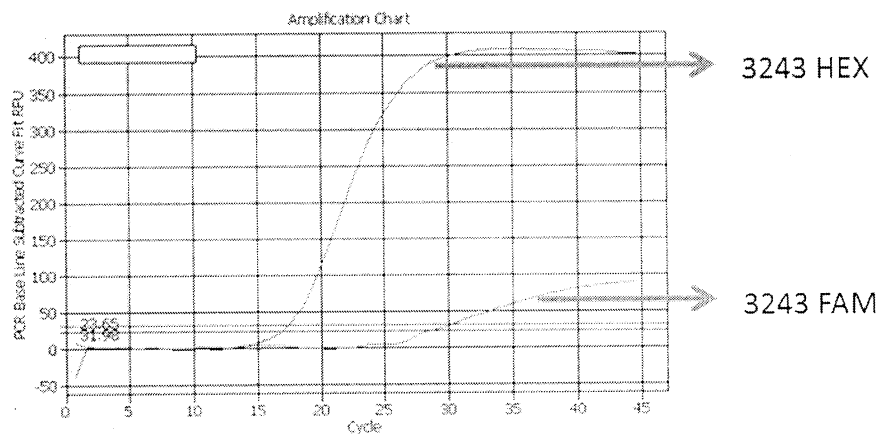
HÌNH 2



HÌNH 3

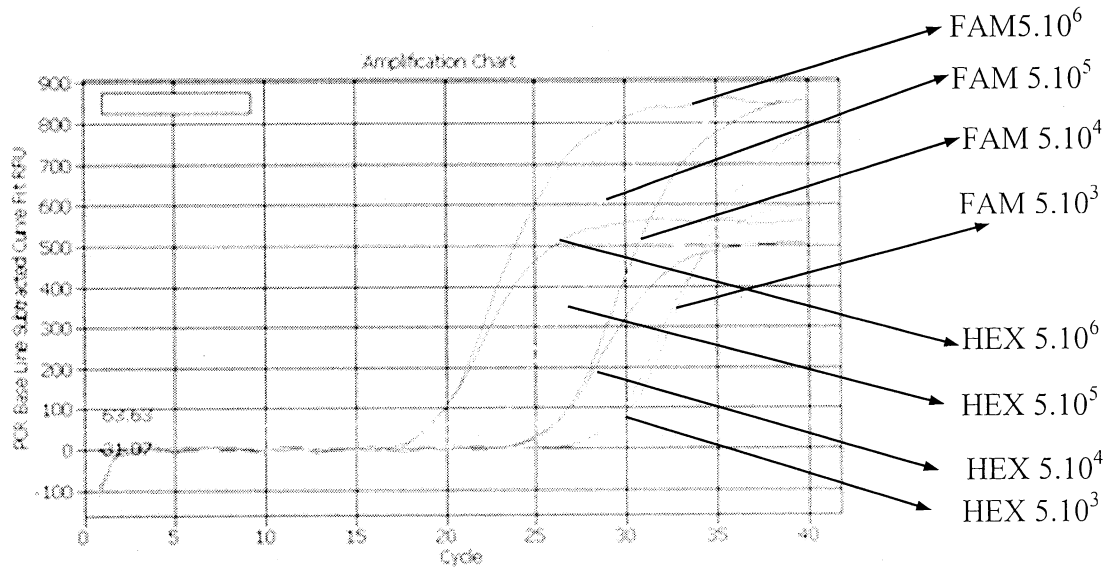


HÌNH 4

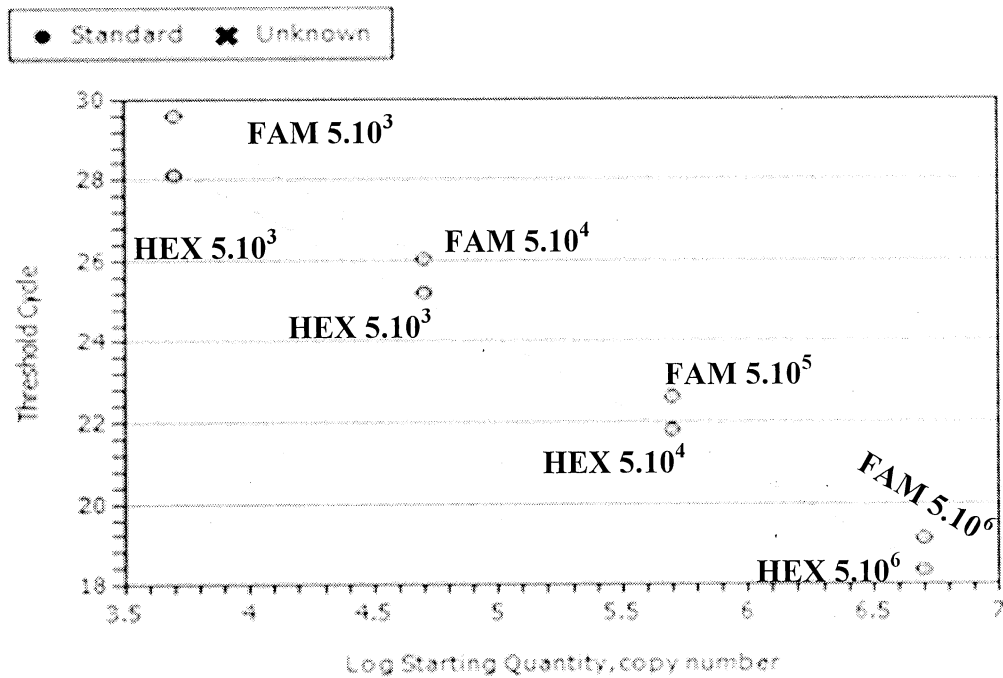


HÌNH 5

5A

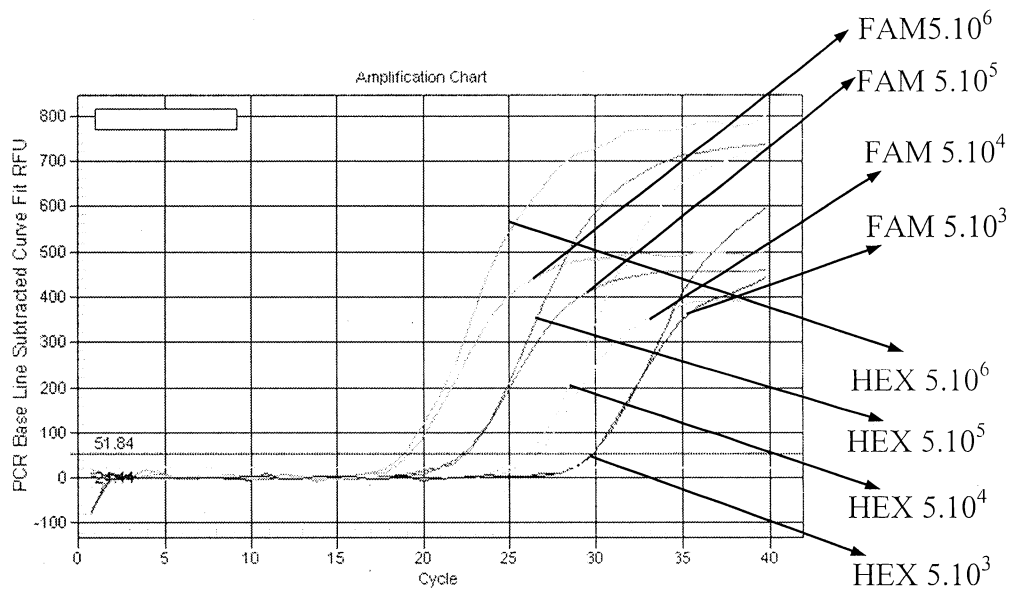


5B

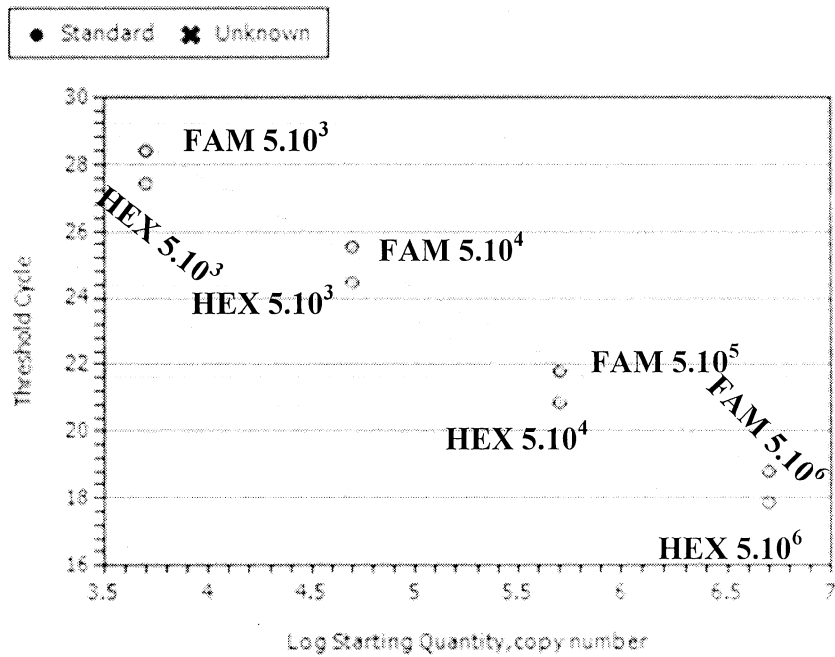


HÌNH 6

6A

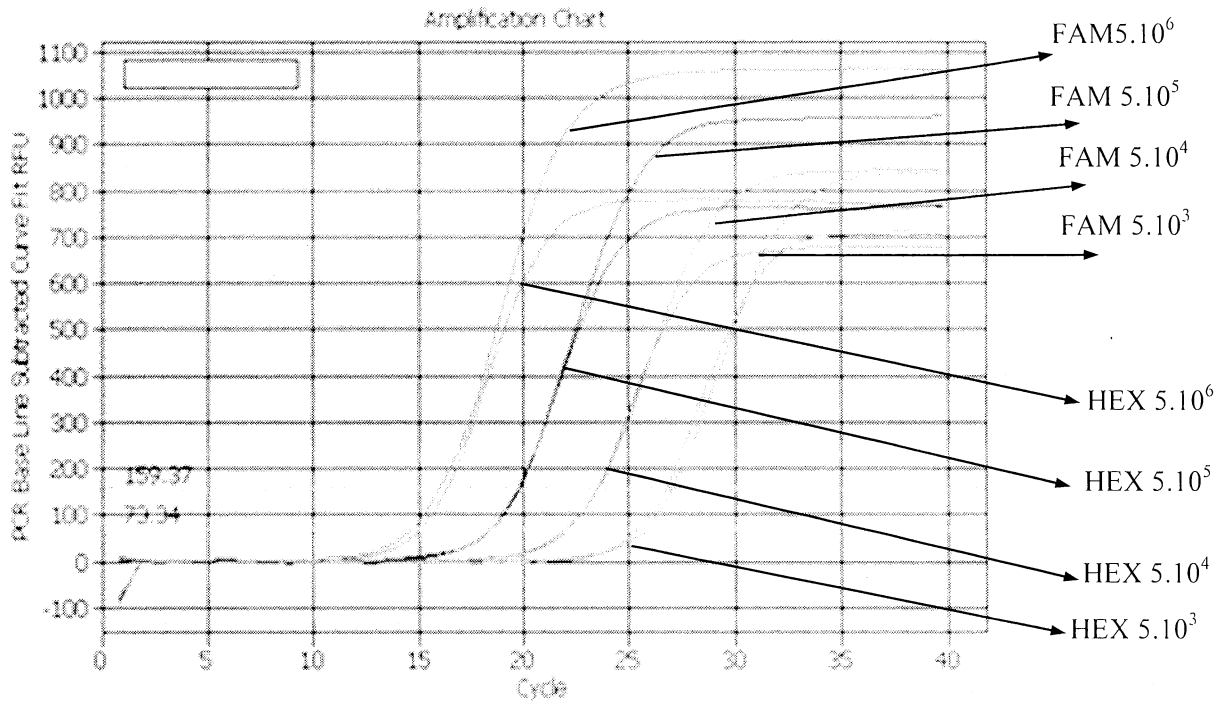


6B

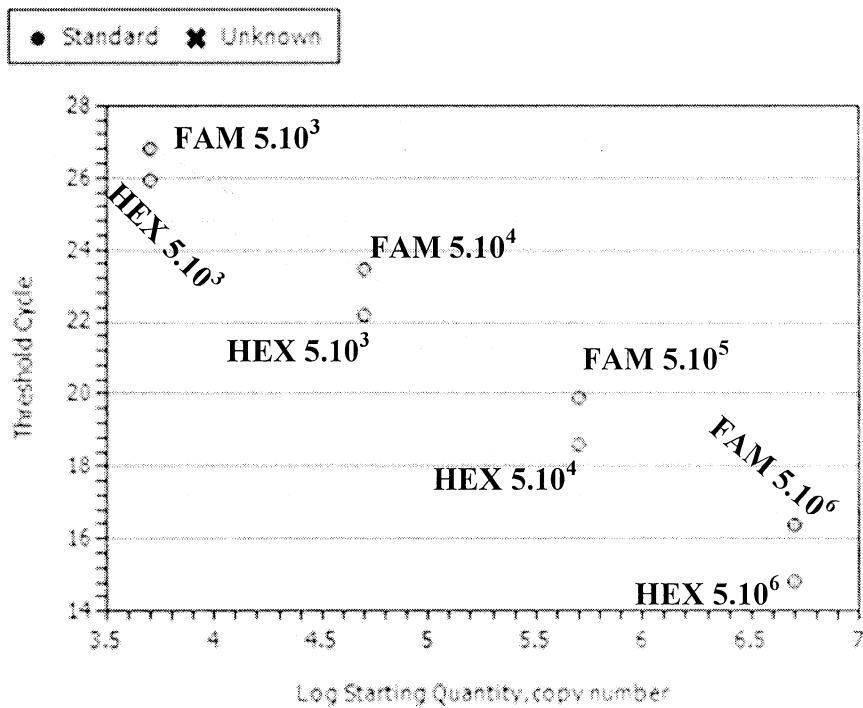


HÌNH 7

7A



7B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> Kit để xác định đột biến điểm trên gen ty thể và quy trình sản xuất kit này

<130>
 <160>42
 <170>

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

<220>
 <400> 1
 CCACACCCACCCAAGAACAG

<210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn môi

<220>
 <400> 2
 AGGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTT

<210> 3
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dờ

<220>
 <400> 3
 CCGGGCTCTGCCAT

<210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dờ

<220>
 <400> 4
 CCGGGCCCTGCCAT

<210> 5
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa A3243 của gen ty thể người

<220>
 <400> 5
 CAAGAGAAATAAGGCTTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAAATGATATCATCTCAACT 60
 TAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCCGTAAT 120
 CGCATAAAACTTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCA 180
 TGGCTAACCTCCTACTCC 198

<210> 6
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa A3243G của gen ty thể người

<220>
 <400> 6
 CAAGAGAAATAAGGCTTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAAATGATATCATCTCAACT 60
 TAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGGGCCCCGTAAT 120
 CGCATAAAACTTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCA 180
 TGGCTAACCTCCTACTCC 198

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi

<220>
 <400> 7
 GGCCAACCTCCTACTCCTCAT

<210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mồi

<220>
 <400> 8
 CCTACAACGTTGGGGCCTTTG

<210> 9

<211>14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 9
 ATTTTTCGTTTCGGT

<210> 10
 <211>14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 10
 ATTTTTTGTTTCGGT

<210> 11
 <211>306
 <212> ADN
 <213>Plasmit pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa G3380 của gen ty thể người

<220>
 <400> 11
 CAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCA 60
 TTGTACCCATTCTAATCGCAATGGCATTCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCT 120
 ATATACAACCTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAACCCTTCG 180
 CTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATCACCC 240
 TCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCC 300
 CCATAC 306

<210> 12
 <211> 306
 <212> ADN
 <213> Plasmit pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa G3380A của gen ty thể người

<220>
 <400> 12
 CAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCA 60
 TTGTACCCATTCTAATCGCAATGGCATTCCTAATGCTTACCGAACAAAAAATTCTAGGCT 120
 ATATACAACCTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAACCCTTCG 180
 CTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATCACCC 240
 TCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCC 300
 CCATAC 306

<210> 13
 <211>19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<220>
 <400> 13

AGCCCACTGTAAAGCTAAC

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

<220>
 <400> 14
 GGCATTTCACTGTAAAGAGGT

<210> 15
 <211>14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dờ

<220>
 <400> 15
 AGATTAAGAGAACC

<210> 16
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dờ

<220>
 <400> 16
 GATTAAGAGAGCC

<210> 17
 <211> 210
 <212> ADN
 <213>Plasmit pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa A8344 của gen ty thể người
 <220>

<400> 17
 GGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCAGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGT 60
 CCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCC 120
 CCTCTACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACCTTTTAAGTTAAAG 180
 ATTAAGAGA**ACCC**CACCTCTTTACAGGAA 210

<210> 18
 <211> 212
 <212> ADN
 <213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> Đoạn chứa A8344G của gen ty thể người

<220>
 <400> 18
 GGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGT 60
 CCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCC 120
 CCTCTACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTTAGCATTAACCTTTTAAGTTAAA 180
 GATTAAGAGAG**CCCC**CACCTCTTTACAGGAAA 212

<210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mới

<220>
 <400> 19
 CGAAACCATCAGCCTACTCATTCAA

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mới

<220>
 <400> 20
 CCTGCAGTAATGTTAGCGGTTAGG

<210> 21
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 24
 AAT**AGCCCTGGCC**

<210> 22
 <211>15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 22
 AATAGCCC GGGCCGT

<210> 23
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa T8993 của gen ty thể người

<220>
 <400> 23

CAACTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTCATTTACACCAACCACCCA	60
ACTATCTATAA	
ACCTAGCCATGGCCATCCCCTTATGAGCGGGCGCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGA	120
TTAAAAATGCCCTAGCCCACCTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATAC	180
TAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCCTGGCCGTACGCCTAA	240
CCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAA	300
TATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTATCATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTA	360
TCCTAGAAATCGCTGTCTGCCTTAATCCAAGCCTACGTTTTCA	402

<210> 24
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> đoạn chứa T8993G của gen ty thể người

<220>
 <400> 24

CAACTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTCATTTACACCAACCACCCA	60
ACTATCTATAA	
ACCTAGCCATGGCCATCCCCTTATGAGCGGGCGCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGA	120
TTAAAAATGCCCTAGCCCACCTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCCATAC	180
TAGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCCTGGCCGTACGCCTAA	240
CCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAA	300
TATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTATCATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTA	360
TCCTAGAAATCGCTGTCTGCCTTAATCCAAGCCTACGTTTTCA	402

<210> 25
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Đoạn dò

<220>

<400> 25

ATAGCCCCGGCCGT

<210> 26

<211> 402

<212> ADN

<213> Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α

<220>

<223> Đoạn chứa T8993C của gen ty thể người

<220>

<400> 26

CAACTAACCT	CCTCGGACTC	CTGCCTCACT	CATTTACACC	AACCACCCAA	CTATCTATAA	60
ACCTAGCCAT	GGCCATCCCC	TTATGAGCGG	GCGCAGTGAT	TATAGGCTTT	CGCTCTAAGA	120
TTAAAAATGC	CCTAGCCCAC	TTCTTACCAC	AAGGCACACC	TACACCCCTT	ATCCCCATAC	180
TAGTTATTAT	CGAAACCATC	AGCCTACTCA	TTCAACCAAT	AGCCCCGGCC	GTACGCCTAA	240
CCGCTAACAT	TACTGCAGGC	CACCTACTCA	TGCACCTAAT	TGGAAGCGCC	ACCCTAGCAA	300
TATCAACCAT	TAACCTTCCC	TCTACACTTA	TCATCTTCAC	AATTCTAATT	CTACTGACTA	360
TCCTAGAAAT	CGCTGTCGCC	TTAATCCAAG	CCTACGTTTT	CA		402

<210> 27

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<220>

<400> 27

CTGCCTAGCAAACCTCAAACCTAC

<210> 28

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<220>

<400> 28

GTGGGAGTAGAGTTTGAAGTC

<210> 29

<211> 14

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn dò

<220>
 <400> 29
 ATGATG**CG**ACTGT

<210> 30
 <211>12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò

<220>
 <400> 30
 AT**GATG**TGACTG

<210> 31
 <211>318
 <212> ADN
 <213>Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> Đoạn chứa G11778 của gen ty thể người

<220>
 <400> 31
 CTTACCGGGCGCAGTCATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTG 60
 CCTAGCAAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTC**G**CATCATAATCCTCTCTCAAGGACT 120
 TCAAACCTCTACTCCCACTAATAGCTTTTTTGATGACTTCTAGCAAGCCTCGCTAACCTCGC 180
 CTTACCCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTCTGTGCTAGTAACCACGTTCTCCTG 240
 ATCAAATATCACTCTCCTACTTACAGGACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCT 300
 CTACATATTTACCACATC 318

<210> 32
 <211>381
 <212> ADN
 <213>Plasmid pJET 1.2 của *E.coli* DH5α
 <220>
 <223> Đoạn chứa G11778A của gen ty thể người

<220>
 <400> 32
 CTTACCGGGCGCAGTCATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTG 60
 CCTAGCAAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTC**A**CATCATAATCCTCTCTCAAGGACT 120
 TCAAACCTCTACTCCCACTAATAGCTTTTTTGATGACTTCTAGCAAGCCTCGCTAACCTCGC 180
 CTTACCCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTCTGTGCTAGTAACCACATTCTCCTG 240
 ATCAAATATCACTCTCCTACTTACAGGACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCT 360
 CTACATATTTACCACAACATC 381