



(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)



1-0023729

(51)⁷ C12N 15/11; C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2013-00702

(22) 28/06/2011

(86) PCT/MY2011/000158 28/06/2011

(87) WO2012/021054 16/02/2012

(30) PI2010003802 13/08/2010 MY

(45) 25/05/2020 386

(43) 27/05/2013 302A

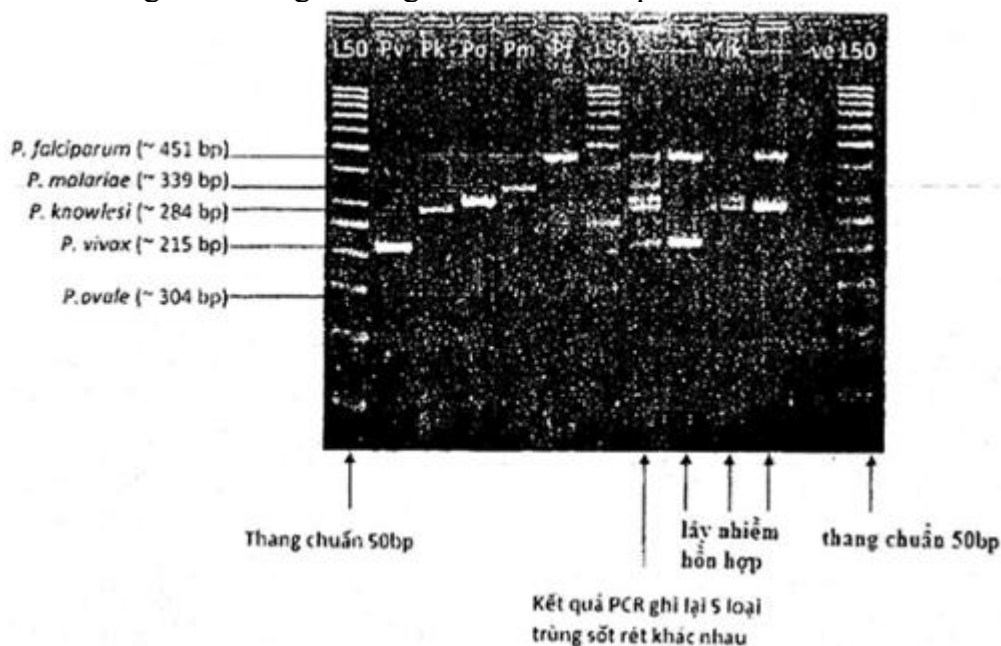
(73) UNIVERSITY OF MALAYA (MY)
50603 Kuala Lumpur (MY).

(72) CHUA, Kek Heng (MY); LEE, Ping Chin (MY); LIM, Ai Lian (MY); CHEW, Ching Hoong (MY)

(74) Công ty cổ phần Tư vấn S&B (S&B CONSULTANT., CORP.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PCR ĐA MÔI ĐỂ CHẨN ĐOÁN KÝ SINH TRÙNG GÂY BỆNH SỐT RÉT

(57) Sáng chế đề cập tới phương pháp PCR đa môi để phát hiện năm loại ký sinh trùng sốt rét (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*) dựa trên PCR đa môi. Nhìn chung, tất cả các đoạn môi được sử dụng trong sáng chế sẽ được tạo ra bằng cách sử dụng cách tiếp cận kỹ thuật tin sinh học. Phương pháp PCR một bước với các điều kiện tối ưu hóa cụ thể. Phương pháp PCR này đủ nhạy để phát hiện các loài ký sinh trùng sốt rét cụ thể ngay cả khi lượng của chúng ở trong máu ở mức thấp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc phát triển phương pháp phản ứng chuỗi (PCR) đa mỗi polymeraza một bước nhảy hơn, đặc hiệu cũng như tiết kiệm chi phí hơn cho việc chẩn đoán năm loại ký sinh trùng gây bệnh sốt rét chính ở người, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh sốt rét vẫn là nguyên nhân chính dẫn đến chết người trên thế giới, đe dọa cuộc sống của hơn một phần ba dân số thế giới. Bệnh sốt rét lan rộng ở nhiều khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, bao gồm các khu vực châu Mỹ, nhiều khu vực châu Á và châu Phi. Bốn mươi phần trăm dân số thế giới sống tại những khu vực bệnh dịch. Mỗi năm, có ít nhất từ 300 triệu đến 500 triệu trường hợp nhập viện do bệnh sốt rét trên thế giới với từ 1,5 đến 2,7 triệu người chết, chủ yếu xảy ra với trẻ em dưới 5 tuổi (Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT (2005) Malaria. Lancet 365:1487-1498; <http://www.cdc.gov/malaria/>; <http://rbm.who.int/wmr2005/>).

Theo Báo cáo về bệnh sốt rét thế giới năm 2005, các trường hợp bệnh sốt rét được báo cáo tại Malaysia là 6.338 (bao gồm 861 trường hợp du nhập) với 21 trường hợp được xác nhận là chết trong năm 2003. Nhìn chung, bang Sarawak có trường hợp được báo cáo là cao nhất với 2.615, tiếp theo là Sabah với 1.770 trường hợp và Pahang với 850 trường hợp (<http://www.rbm.who.int/wmr2005/profiles/malaysia.pdf>).

Bệnh sốt rét ở người thông thường do sự lây nhiễm với một hoặc sự trộn lẫn của bốn loại ký sinh trùng sốt rét, như *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, ký sinh trùng sốt rét ở khỉ như *P. knowlesi* cũng được báo cáo là có ở người (Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SGS, Cox-Singh J, Thomas A, và Conway DJ (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 363: 1017-1024; Jongwutiwes S, Putaporn C, Iwasaki T, Sata T, và Kanbara H (2004). Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* Malaria in human, Thailand. Emerg. Infect. Dis 10:2211-2213). Vào năm 2004, Singh và cộng sự thông báo rằng tất cả lây nhiễm *P.*

malariae trước đó tại Sarawak (trong khoảng từ tháng 3/2000 đến tháng 11/2002) thực sự là *P. knowlesi* dựa trên việc xét nghiệm/phân tích phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) ẩn dấu. *P. knowlesi* được biết đến là có hình thái học giống với *P. malariae* dựa trên sự nhận diện bằng kính hiển vi (Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SGS, Cox-Singh J, ThomasA, và Conway DJ (2004) Phần lớn tập trung vào sự lây nhiễm ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium knowlesi* ở người. Lancet 363:1017-1024).

Nhìn chung, *P. vivax* là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra sự lây nhiễm, và là tác nhân cho khoảng 80% các trường hợp bị sốt rét, tiếp theo là *P. falciparum*, là tác nhân cho khoảng 15% các trường hợp bị lây nhiễm và 90% cái chết (Mendis K, Sina B, Marchesini P, và Carter R (2001) The neglected burden of *Plasmodium vivax* .Am. J., Trop.Med. Hyg, 64:97-106). Trong khi đó, bệnh do ký sinh trùng sốt rét *P. ovale* và *P. malaria* gây ra thì tương đối hiếm. Tại Sarawak, *P. vivax* là ký sinh trùng sốt rét phổ biến, tiếp theo là ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*, *P. malaria* (là ký sinh trùng sốt rét mà bị nhận diện lại là ký sinh trùng *P. knowlesi* thông qua nhận biết phân tử) và sự lây nhiễm các ký sinh trùng hỗn hợp. Không có báo cáo về các trường hợp về ký sinh trùng sốt rét *P. ovale* (Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SGS, Cox-Singh J, ThomasA, và Conway DJ (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 363:1017-1024).

Ký sinh trùng sốt rét sống một phần đời của chúng ở người và một phần ở muỗi (loài *Anopheles*). Muỗi cái *Anopheles* mang mầm nhiễm đóng vai trò như một vật chủ trung gian trong việc truyền bệnh. Vòng đời của ký sinh trùng sốt rét đặc biệt phức tạp và mang tính cụ thể cho từng loại ký sinh trùng sốt rét. Nhìn chung, nó có thể được phân biệt thành ba chu trình sống chính, ví dụ: chu trình ngoài hồng cầu và chu trình trong hồng cầu ở trên vật chủ là người, và chu trình bào tử ở muỗi. Một cách khái quát, các ký sinh trùng sốt rét có giai đoạn trong hồng cầu là tác nhân cho các biểu hiện lâm sàng của bệnh. Do vậy, nó được coi là giai đoạn chẩn bệnh quan trọng ở bệnh sốt rét.

Tới nay đã có một vài phương pháp được sử dụng rộng rãi trên thế giới cho việc chẩn đoán sự lây nhiễm ký sinh trùng sốt rét trong máu. Nhìn chung, việc kiểm tra bằng kính hiển vi đối với lớp màng máu mỏng hoặc dày được nhuộm màu Giemsa duy trì các chuẩn mực vàng cho việc chẩn đoán hàng ngày trong phòng thí nghiệm

(Warhurst DC and Williams JE (1996) Laboratory diagnosis of malaria, J. Clin. Pathol 49:533-538). Việc xét nghiệm nhanh và chi phí thấp cho phép sự nhận diện các ký sinh trùng sốt rét và sự xác định số lượng các ký sinh trùng sốt rét, cả hai điều này đều quan trọng trong việc đánh giá sự nghiêm trọng của bệnh và kê thuốc cho sự điều trị thích hợp. Tuy nhiên, độ nhạy sẽ giảm với sự giảm số lượng ký sinh trùng sốt rét trong máu cũng như các trường hợp lây nhiễm hỗn hợp, có khả năng dẫn đến sự kết luận sai hoặc việc các trùng được xác định không đáng tin cậy (Rougemont M, Saanen MV, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, và Jatton K (2004) Detection of four Plasmodium species in blood from human by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol 42:5636-5643). Gần đây, các kit thử nghiệm miễn dịch sắc ký khác nhau được cung cấp trong thương mại (Chiodini, PL, Bowers K, Jorgensen P, Barnwell JW, Grady KK, Luchavez J, Moody AH, Cenizal A và Bell D (2007) The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 101:331-337). Tuy nhiên, hầu hết các bộ que trên không thể chẩn đoán chính xác loại ký sinh trùng lây nhiễm sốt rét ở người (Moody A (2002) Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin. Microbiol Rev 15:66-78).

Hiện nay, các phương pháp PCR, như PCR tổ hợp, PCR đa môi và PCR thời gian thực thay thế cho việc kiểm tra bằng kính hiển vi. Các xét nghiệm PCR được dựa trên sự phân tích trình tự gen sử dụng các cặp môi của loài cụ thể và được bảo tồn giữa các loài của 18S ribosomal ARN cấu trúc dưới phân tử nhỏ (ssrRNA). Vì vậy, nó có thể phát hiện thành công các ký sinh trùng sốt rét trong trường hợp lây nhiễm hỗn hợp cũng như những ký sinh trùng sốt rét với số lượng ký sinh trùng sốt rét thấp. Mặc dù các phương pháp PCR được chỉ ra trong nhiều trường hợp có độ nhạy và tính đặc trưng cao đối với việc chẩn đoán bệnh sốt rét, chúng vẫn có một vài giới hạn. Nhìn chung, các phương pháp PCR tương đối mất nhiều thời gian (đặc biệt là kỹ thuật PCR tổ hợp), tốn kém chi phí (kỹ thuật PCR thời gian thực) và cũng yêu cầu nhiều quá trình phức tạp. Trong số các phương pháp PCR, phương pháp PCR đa môi dường như là xét nghiệm lý tưởng nhất trong việc phát hiện ra bệnh sốt rét, tuy nhiên, có một số thiếu sót trong việc bộc lộ trong lĩnh vực này do những khó khăn trong việc tạo ra các cặp môi cũng như quá trình tối ưu hóa. Hiện nay, mức độ phát hiện của PCR đa môi được công bố chỉ lên tới 2 loại ký sinh trùng, ví dụ *P. falciparum* và *P. vivax* (Kho WG,

Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, Jongwutives S and Tanabe (2003) A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Parasitol. Int, 52:229-236; Padley D, Moody AH, Chiodini PL, và Saldanha J (2003) Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. Ann. Trop. Med. Parasitol, 97:131-137; Patsoula E, Spanakos G, Sofianatou D, Parara M và Vakalis NC (2003) A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* và *P. falciparum*. Ann. Trop. Med. Parasitol, 97:15-21). Vì vậy, việc phát triển một xét nghiệm đa mồi một bước thuận tiện hơn là rất quan trọng trong việc nhận diện tất cả các ký sinh trùng sốt rét ở người trong bệnh sốt rét.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp PCR đa mồi đơn bước để chẩn đoán năm loại ký sinh trùng sốt rét chính *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất đoạn nucleotit bao gồm trình tự bazơ (SEQ ID NO:1) và (SEQ ID NO:6) được nêu trong các trình tự bên dưới (SEQ ID NO:1) và (SEQ ID NO:6), cặp trình tự bazơ bổ sung cho những trình tự nêu trên hoặc trình tự đột biến của những trình tự này; và một cặp mồi để phát hiện ra ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* bao gồm các đoạn nucleotit sau đây:

5'ATTTAAACCTTCCCAGAGTAAC3' (SEQ ID NO:1)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

Mục đích khác nữa của sáng chế đề cập đến cặp đoạn nucleotit bao gồm trình tự bazơ (SEQ ID NO:2) và (SEQ ID NO:6), cặp trình tự bazơ bổ sung cho trình tự này hoặc trình tự đột biến của trình tự này; và một cặp mồi để phát hiện ký sinh trùng sốt rét *P. malariae* bao gồm các đoạn nucleotit sau đây:

5'TGTATATTTATAACAAAGTTGTAC3' (SEQ ID NO:2)

5'GAATTTACCTCTGAGATCTG3' (SEQ ID NO:6)

Ngoài ra, một mục đích khác của sáng chế là đề xuất cặp đoạn nucleotit bao gồm trình tự bazơ (SEQ ID NO:3) và (SEQ ID NO:6) được thể hiện bằng trình tự (SEQ ID NO:3) và (SEQ ID NO:6) sau đây, cặp trình tự bazơ bổ sung cho những trình tự này

hoặc trình tự đột biến của những trình tự này; và một cặp mồi để phát hiện ra ký sinh trùng sốt rét *P. ovale* bao gồm các đoạn nucleotit sau đây:

5'AAGATGCTTAGACAATAACAACG3' (SEQ ID NO:3)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

Một mục đích xa hơn của sáng chế là đề xuất cặp đoạn nucleotit bao gồm trình tự bazơ (SEQ ID NO:4) và (SEQ ID NO:6) được thể hiện bởi trình tự (SEQ ID NO:4) và (SEQ ID NO:6), cặp trình tự bazơ bổ sung cho các trình tự này hoặc trình tự đột biến của các trình tự này; và một cặp mồi để phát hiện ra ký sinh trùng sốt rét *P. knowlesi* bao gồm các đoạn nucleotit sau đây:

5'CTTTATGTGCGCATCCTCTAC3' (SEQ ID NO:4)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

Cũng là mục đích xa hơn của sáng chế là đề xuất cặp nucleotit bao gồm trình tự bazơ (SEQ ID NO:5) và (SEQ ID NO:6) được thể hiện bởi trình tự sau đây (SEQ ID NO:5) và (SEQ ID NO:6), cặp trình tự bazơ bổ sung cho các trình tự này hoặc trình tự đột biến của các trình tự này; và một cặp mồi để phát hiện ký sinh trùng sốt rét *P. vivax* bao gồm các đoạn nucleotit sau đây:

5'GACTTTCTTTGCTTCGGCTTG3' (SEQ ID NO:5)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh minh họa bản sao ảnh chụp chỉ ra các sản phẩm khuếch đại PCR được tạo ra bằng cách sử dụng sự kết hợp của các cặp mồi SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO. 5 cùng với SEQ ID NO:6.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp PCR đa mồi một bước cho việc chẩn đoán năm loại ký sinh trùng sốt rét chính *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi* phù hợp với sáng chế như đã đề cập sẽ được mô tả chi tiết hơn trong đây. Khảo sát và phân tích các trình tự khác nhau được công bố của các loại ký sinh trùng sốt rét trong dữ liệu đã được thực hiện. Các cặp đa mồi oligonucleotit được tạo ra dựa trên cơ sở các loài khác nhau được duy trì và các trình tự ssrRNA của các loài cụ thể. PCR của mỗi cặp mồi

ban đầu sẽ được tối ưu hóa một cách riêng rẽ trong điều kiện đơn môi và sau đó sẽ được kết hợp và tiếp tục tối ưu hóa để đạt được điều kiện đa môi.

Để xác định được giới hạn phát hiện ra PCR đa môi, các plasmit thể gen tái tổ hợp của mỗi loài có chứa một đoạn từ gen 18S *ssrRNA* được tạo ra. Các sản phẩm PCR (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*) được sàng lọc và buộc vào trong pC®IIvector sinh sản vô tính TOPO TA (Invitrogen) và được chuyển thành *E. coli* trình độ Hạng 10. Việc tách plasmit thể gen tái tổ hợp ADN được thực hiện với QIAprep Miniprep (Qiagen) và việc chèn đúng vị trí được xác nhận bởi sự sắp xếp trình tự.

Các cặp môi riêng biệt 6 được thể hiện bởi các trình tự (SEQ ID NO:1 đến 6) đã được phát triển trong sáng chế có thể được phân loại theo đặc điểm của chúng theo cách thức sau đây:

(A) Cặp môi cho việc phát hiện có tính chọn lọc ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* bao gồm 2 đoạn nucleotit sau đây:

5'GAAAATTCCTTTTCGGGGA3' (SEQ ID NO:1)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

(B) Cặp môi cho việc phát hiện có tính chọn lọc ký sinh trùng sốt rét *P. malariae* bao gồm 2 đoạn nucleotit sau đây:

5'TGTATATTTATAACAAAGTTGTAC3' (SEQ ID NO:2)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

(C) Cặp môi cho việc phát hiện có tính chọn lọc ký sinh trùng sốt rét *P. ovale* bao gồm 2 đoạn nucleotit sau đây:

5'AAGATGCTTAGACAATACAACG3' (SEQ ID NO:3)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

(D) Cặp môi cho việc phát hiện có tính chọn lọc ký sinh trùng sốt rét *P. knowlesi* bao gồm 2 đoạn nucleotit sau đây:

5'CTTTATGTGCGCATCCTCTAC3' (SEQ ID NO:4)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO:6)

(E) Cặp môi cho việc phát hiện có tính chọn lọc ký sinh trùng sốt rét *P. vivax* bao gồm 2 đoạn nucleotit sau đây:

5'GACTTTCTTTGCTTCGGCTTG3' (SEQ ID NO:5)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3'

(SEQ ID NO:6)

Khi các đoạn nucleotit theo sáng chế có các trình tự bazơ được đề cập ở trên, một cách tương ứng, được sử dụng như một cặp mồi hoặc các cặp mồi một cách đơn lẻ hoặc kết hợp khác nhau với một cặp mồi khác, năm loại ký sinh trùng sốt rét spp Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*) có thể được phát hiện một cách dễ dàng, nhanh chóng, chi phí hiệu quả và với độ nhạy cao cùng một lúc hoặc được phân biệt một cách chính xác với ký sinh trùng sốt rét khác.

Để minh họa thêm cho sáng chế được đề cập một cách chi tiết hơn và không bị giới hạn, các ví dụ sau đây được đưa ra.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Cuộc kiểm tra ngẫu nhiên 100 mẫu lâm sàng đã được thực hiện với phân tích PCR đa mồi được phát triển cho các nghiên cứu về độ nhạy và tính đặc trưng.

Toàn bộ mẫu máu từ các bệnh nhân với sự nghi ngờ mắc bệnh sốt rét (bởi sự kiểm tra bằng kính hiển vi và kính phết dày hoặc mỏng được nhuộm màu) được thu thập lại. ADN được chiết ra từ băng tan, ba PBS lặp lại được rửa và tiếp theo sau là 0,05% saponin dùng để chống lại sự đông máu bằng cách sử dụng Bộ dụng cụ nhỏ QIAamp ADN (Qiagen) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

ADN được chiết ra được dùng để tối ưu hóa điều kiện PCR bằng cách sử dụng 15 µl hỗn hợp PCR đang hoạt động bao gồm 6 cặp mồi cụ thể (SEQ ID NO: 1 đến 6) và các xác định hóa chất. Điều kiện tối ưu hóa PCR để đạt được kết quả như mong muốn là 95°C trong 3 phút (1 vòng/chu kỳ); 95°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây, 65°C trong 40 giây (35 vòng/chu kỳ); 65 độ C trong 10 phút (1 vòng/chu kỳ).

Công thức và nồng độ của hỗn hợp PCR làm việc được thể hiện như sau:

Đệm 10X PCR	1,2X
25 mM MgCl ₂	2,0 mM
10 mM dNTP mix (Fermentas)	0,2 mM mỗi chất
P. GENUS (50 pMol)	0,5 pMol
P. FALCI (50 pMol)	0,5 pMol
P. MAL (50 pMol)	0,5 pMol
P. OVA (50 pMol)	0,5 pMol

P. KNOW (50 pMol)	0,5 p,Mol
P. VIV (50 pMol)	0,5 pMol
Mẫu ADN	10 pg
5U/ul Maxima Hotstart Taq ADN polymeraza (Fermentas)	1 đơn vị

Sau đó, các sản phẩm PCR được điện di trong 3% (w/v) gel agarosa. Kết quả được chỉ ra trong Hình 1 và Bảng 1. Đoạn nucleotit SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:6 được sử dụng trong phản ứng chuỗi polymeraza khuếch đại các đoạn ADN dựa trên các ký sinh trùng sốt rét (451 bp đối với *P. falciparum*, 215 bp đối với *P. vivax*, 339 bp đối với *P. malariae*, 304 bp đối với *P. ovale* và 284 bp đối với *P. knowlesi*)

Bảng 1

STT	Đoạn nucleotit	Số gốc	Kích cỡ như mong muốn
1	5'ATTTAAAACCTTCCCAGAGTAAC3'	23	451
2	5'TGTATATTTATAACAAAGTTGTAC3'	24	339
3	5'AAGATGCTTAGACAATACAACG3'	22	304
4	5'CTTTATGTGCGCATCCTCTAC3'	21	284
5	5'GACTTTCTTTGCTTCGGCTTG3'	21	215
6	5'GAATTTACCTCTGACATCTG3'	21	

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp PCR đa mỗi một bước cho việc chẩn đoán năm loài ký sinh trùng gây bệnh sốt rét chính *Plasmodium* spp bao gồm *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* và *P. knowlesi*, trong đó các đoạn nucleotit được nêu trong các trình tự sau:

5'ATTTAAAACCTTCCCAGAGTAAC3' (SEQ ID NO: 1)

5'TGTATATTTATAACAAAGTTGTAC3' (SEQ ID NO: 2)

5'AAGATGCTTAGACAATACAACG3' (SEQ ID NO: 3)

5'GACTTTCTTTGCTTCGGCTTG3' (SEQ ID NO: 4)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO: 5)

5'GAATTTACCTCTGACATCTG3' (SEQ ID NO: 6)

hoặc các trình tự bazơ bổ sung cho các trình tự này.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó điều kiện PCR được tối ưu hóa để đạt được các kết quả như mong muốn là 95°C trong 3 phút (1 chu kỳ); 95°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây, 65°C trong 40 giây (35 chu kỳ); 65°C trong 10 phút (1 chu kỳ).

HÌNH 1

