



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002341

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00089

(22) 18/03/2016

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/09/2017 354A

(73) Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội (ĐHQGHN) (VN)
Nhà Y1, số 2, Phạm Văn Đồng, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đinh Đoàn Long (VN); Phạm Thị Hồng Nhung (VN); Dương Thị Ly Hương (VN);
Vũ Thị Thơm (VN).

(54) QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH RS28364072 CỦA GEN MÃ HÓA THỤ THỂ GẮN
VỚI IGE ÁI LỰC THẤP (FCER2)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (FCER2), quy trình này bao gồm các bước: a) tách chiết ADN tổng số từ mẫu máu của trẻ em; b) kiểm tra độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số; c) nhân đoạn gen FCER2 mong muốn bằng cặp mồi đặc hiệu; d) thu sản phẩm phản ứng PCR; và e) xác định tính đa hình rs28364072 của gen FCER2 thu được. Quy trình theo giải pháp hữu ích xác định được các đa hình rs28364072 của gen FCER2 hữu ích để sàng lọc các bệnh nhân có khả năng đáp ứng với thuốc điều trị corticoit, đặc biệt là trẻ em bị bệnh hen phế quản.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng trong phân tích, cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (*FCER2*). Quy trình theo giải pháp hữu ích thích hợp để sàng lọc các bệnh nhân có khả năng đáp ứng với thuốc điều trị với thuốc điều trị corticoit, đặc biệt là trẻ em bị bệnh hen phế quản.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh hen phế quản là một trong những bệnh phổi mạn tính phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới. Bệnh do nhiều nguyên nhân gây nên và có xu hướng ngày càng tăng. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, năm 2004, trên thế giới có hơn 300 triệu người mắc bệnh hen phế quản với từ 6 đến 8% là người lớn, hơn 10% ở trẻ em dưới 15 tuổi, ước tính đến năm 2025, con số này tăng lên đến 400 triệu người (Masoli, 2004; Matthew, 2004). Sự gia tăng nhanh chóng của bệnh hen phế quản ở khắp các châu lục trên thế giới được báo cáo bởi GINA (Global Initiative for Asthma) năm 2004: Ở Vương quốc Anh và nước cộng hòa Ailen có tỷ lệ bệnh hen phế quản cao nhất thế giới (16,1%), tỷ lệ bệnh hen phế quản hiện nay cao gấp 5 lần so với 25 năm trước; tại châu Đại Dương, tỷ lệ bệnh hen phế quản là 14,6%, tăng nhanh trong thập kỷ qua; ở Bắc Mỹ là 11,2%, tỷ lệ bệnh hen phế quản ở trẻ em và thanh thiếu niên tăng từ 25-75% trong mỗi thập kỷ từ năm 1960 đến nay; vùng nam châu Phi có tỷ lệ bệnh hen phế quản 8,1%; tỷ lệ bệnh hen phế quản ở đây cao hơn các vùng khác của châu Phi (Matthew, 2004). Ở khu vực Đông Nam Á- Tây Thái Bình Dương, tình hình bệnh hen phế quản trẻ em trong 10 năm (1984-1994) cũng tăng lên đáng kể: Nhật Bản từ 0,7-8%, Singapore từ 5-20%, Indonesia từ 2,3-9,8%, Philippin từ 6-18,8% (Dự án phòng chống bệnh hen phế quản, 2007).

Sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh hen phế quản, đặc biệt ở trẻ em, sẽ dẫn đến một loạt các hệ lụy, bao gồm: tăng gánh nặng về chăm sóc y tế, tăng chi phí điều trị, giảm khả năng lao động, ảnh hưởng đến sức khỏe, thể lực của mỗi cá nhân, và ảnh hưởng xấu đến toàn xã hội. Ước tính ở Hoa Kỳ (năm 1998), khoảng 12,6 tỷ đô la được chi cho việc chẩn đoán và kiểm soát bệnh hen, trong đó chủ yếu là chi phí dành cho thuốc điều

trị (Weiss, 2006). Năm 2007, chi phí dành để điều trị bệnh hen cũng là 20 tỷ, trong đó chiếm tỷ lệ cao nhất vẫn là chi phí về thuốc điều trị (Tantisira, 2009). Các nhóm thuốc điều trị bệnh hen có thể chia làm 3 loại chính là 1) thuốc cường β_2 -adrenergic (albuterol, salmeterol, fenoterol); 2) Các corticoit (beclomethasone, triamcinolon, prednison); và 3) thuốc tác động trên hệ leukotriene (montelukast, zafirlukast, zileuton) (Silverman, 2001; Tantisira, 2009). Thuốc cường β_2 -adrenergic có 2 loại là thuốc cường β_2 -adrenergic tác dụng ngắn (SABA, short-acting β_2 -agonists) và thuốc cường β_2 -adrenergic tác dụng kéo dài (LABA, long-acting β_2 -agonists). Các thuốc cường β_2 -adrenergic tác dụng ngắn (SABA) với đặc điểm là làm giãn phế quản nhanh và ngắn, được lựa chọn để cắt cơn hen cấp, trong tất cả các giai đoạn của bệnh hen. Để điều trị duy trì và kiểm soát bệnh hen, các nhóm thuốc được lựa chọn là corticoit đường khí dung (ICS), thuốc cường β_2 -adrenergic tác dụng kéo dài (LABA), thuốc tác động trên hệ leukotriene, corticoid đường uống, hoặc các thuốc khác (như thuốc hủy phó giao cảm ipratropium, theophyllin, thuốc kháng IgE).

Mặc dù có nhiều loại thuốc điều trị bệnh hen sẵn sàng đáp ứng về mặt lâm sàng, nhưng có tới 50% bệnh nhân không đáp ứng với ít nhất 1 trong các nhóm thuốc nói trên (Drazen, 2000;) Theo nghiên cứu của Malmstrom và cộng sự (1999) khi so sánh hiệu quả điều trị của montelukast (một thuốc đối kháng leucotrien) với beclomethason (một loại corticoit đường khí dung) dựa trên sự cải thiện thông số FEV1 giữa trước và sau điều trị thì kết quả cho thấy: phần lớn bệnh nhân không có sự cải thiện chỉ số FEV1 sau điều trị, số bệnh nhân có tăng chỉ số FEV1 sau điều trị tương đương với số bệnh nhân giảm chỉ số FEV1, nghĩa là số bệnh nhân có đáp ứng tốt tương đương với số bệnh nhân có đáp ứng kém (Malmstrom, 1999). Nghiên cứu của Szeftl và cộng sự (2002) cũng cho thấy chỉ có dưới 5% bệnh nhân có cải thiện chỉ số FEV1 sau 24 tuần điều trị với budesonide hoặc fluticasone theo đường khí dung (Szeftl, 2002).

Có rất nhiều nguyên nhân ảnh hưởng đến đáp ứng điều trị bệnh hen phế quản. Một trong những nguyên nhân đó là do sự khác biệt về di truyền ảnh hưởng đến đáp ứng thuốc. Trong hơn một thập kỷ qua đã có nhiều nghiên cứu về di truyền nhằm tìm ra các gen đích và các SNP (Single Nucleotide Polymorphism) mục tiêu có liên quan chặt chẽ đến đáp ứng điều trị bệnh hen phế quản.

Corticoit dùng qua đường khí dung là những thuốc được sử dụng phổ biến nhất

và hiệu quả nhất trong điều trị bệnh hen phế quản mãn tính (Tantisira, 2009), song tác dụng không mong muốn của corticoit tương đối nhiều khiến việc sử dụng corticoit bị hạn chế, đặc biệt ở trẻ em. Phân tích các yếu tố di truyền liên quan đến đáp ứng với corticoit có ý nghĩa lâm sàng, bởi nó sẽ giúp phân loại bệnh nhân, và định hướng điều trị bằng corticoit sớm hơn, hoặc với liều thấp hơn trên những cá thể có đáp ứng tốt, nhằm mang lại hiệu quả điều trị tối ưu với tác dụng không mong muốn thấp nhất; hoặc chỉ định dùng các thuốc khác thay thế corticoit để kiểm soát bệnh hen trên những cá thể có kiểu gen không đáp ứng với corticoit.

Các gen liên quan đến con đường corticoit có thể kể đến là: gen *CRHR1* (corticotropin-releasing hormone receptor 1: CRHR1) mã hóa thụ thể giải phóng hormon corticotropin 1, gen *TBX21* (mã hóa yếu tố ảnh hưởng đến sự sản xuất lympho T), gen *FCER2* (mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp) (Tantisira, 2009), gen *GLCCI1* (glucocorticoid-induced transcript 1: GLCCI1) mã hóa sự phiên mã gây ra bởi glucocorticoid 1 (Tantisira, 2011).

FCER2 là một gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp. Vị trí rs28364072 là đột biến nằm ở vùng intron tại đó, T tại vị trí 2206 được thay bằng C, tính từ nucleotit số 7 theo chiều 3' exon 9 của gen *FCER2*. Các alen C có liên quan với nồng độ IgE tăng cao ở bệnh nhân hen suyễn. Đột biến thay T bằng C của gen *FCER2* đã được chứng minh có liên quan với việc tăng nguy cơ các đợt kịch phát với những bệnh nhân sử dụng corticoit dạng hít.

Tài liệu Tantisira K. et al. (2004). “Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in *CRHR1* with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids”, *Human Molecular Genetics*, 13 (13): 1353–1359, đã đề cập đến mối tương quan giữa các đa hình gen *CRHR1* và đáp ứng điều trị corticoit ở các bệnh nhân được điều trị.

Tài liệu Koster S. E. et al. (2011). “*FCER2*T2206C variant associated with chronic symptoms and exacerbations in steroid-treated asthmatic children”, *Allergy*; 66: 1546–1552, đề cập đến mối liên quan của đa hình rs28364072 của gen *FCER2* và đáp ứng điều trị corticoit ở trẻ em bị bệnh hen phế quản.

Tuy nhiên, chưa có tài liệu nào đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen *FCER2* nhằm làm cơ sở cho việc đánh giá khả năng đáp ứng thuốc điều trị corticoit của các bệnh nhân trẻ em bị bệnh hen phế quản.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen *FCER2*. Quy trình cho phép sàng lọc các bệnh nhân có khả năng đáp ứng tốt với thuốc điều trị corticoit, đặc biệt ở trẻ em bị bệnh hen phế quản. Quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (*FCER2*) theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) thu ADN tổng số bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu của trẻ em bị mắc bệnh hen phế quản theo quy trình chuẩn, sau đó điện di trên gel agarosa nồng độ 0,7% pha trong đệm TAE và đo mật độ quang ở các bước sóng 260 nm và 280 nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,134 µg/ml đến 2,945 µg/ml;

b) chuẩn bị phản ứng PCR với thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 0,134 µg/ml đến 2,945 µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2 mM; đệm MgSO₄ 10X với nồng độ 1X; mỗi xuôi 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3mM; mỗi ngược 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3 mM; Pfu ADN polymeaza 2,5 u/µl với nồng độ 0,0 5u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl;

c) nhân đoạn gen *FCER2* mong muốn bằng cách thực hiện phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 64 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút;

d) thu sản phẩm phản ứng PCR bằng cách điện di trên gel agarosa 1% trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 60V trong 60 phút thu được băng kích thước 818 bp chứa vùng đa hình rs28364072 của gen *FCER2*; và

e) xác định tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* bằng cách tinh sạch 20 µl sản phẩm PCR kích thước 818 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh điện di ADN tổng số trên gel agaroza 0,7%. M: thang chuẩn Lambda ADN/HindIII. Từ 01 đến 08: ADN tổng số của 8 bệnh nhân bệnh nhân tương ứng.

Hình 2 là ảnh điện di sản phẩm PCR nhân vùng chứa rs28364072 trên gel agaroza 1%. (-): Đối chứng âm. M: thang chuẩn Ruler 100 bp Plus ADN. Từ 01 đến 03: sản phẩm PCR tương ứng với bệnh nhân mã 1, 2 và 3.

Hình 3: Kết quả giải trình tự vị trí đa hình rs28364072 của bệnh nhân mã số 01 (hình A) với kiểu gen TC, bệnh nhân mã số 02 (hình B) với kiểu gen TT và bệnh nhân mã số 06 (hình C) với kiểu gen CC.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết với những phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể. Các phương án và các ví dụ này được đưa ra nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Mẫu để phân tích được sử dụng là mẫu máu của bệnh nhân, tốt nhất là từ mẫu máu của bệnh nhân nhi đã được chẩn đoán bị mắc bệnh hen phế quản cần xác định tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2*. Mẫu này thường bao gồm từ 300 µl đến 1,5 ml máu lấy từ tĩnh mạch vào ống đựng mẫu chứa EDTA chống đông. Mẫu được kiểm soát và bảo quản ở -20°C cho đến khi được sử dụng để phân tích theo quy chuẩn mẫu phân tích áp dụng ở các cơ sở y tế.

Các hóa chất được sử dụng là các loại hóa chất có thể mua hoặc đặt tổng hợp từ các công ty chuyên cung cấp sinh phẩm, ví dụ, các cặp môi theo giải pháp hữu ích có thể được thiết kế và được đặt tổng hợp bởi IDT- Hoa Kỳ. Các hóa chất chuyên dụng sử dụng cho PCR hoặc các kit được sử dụng để tinh sạch ADN có thể mua được trên thị trường, ví dụ từ các nhà cung cấp Fermentas, Thermo Scientific, Affymetrix, Omega Bio-tex, Merk hoặc Omega-Biotek.

Quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (*FCER2*) theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) thu ADN tổng số; b)

chuẩn bị phản ứng PCR; c) nhân đoạn gen *FCER2* mong muốn; d) thu sản phẩm phản ứng PCR; và e) xác định tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2*.

Trong bước thu ADN tổng số, mẫu phân tích, cụ thể là mẫu máu của trẻ em bị mắc bệnh hen phế quản được tách chiết theo quy trình chuẩn. Các quy trình xử lý mẫu, tách chiết ADN được thực hiện theo quy trình chuẩn hoặc bằng kit tách ADN thương mại theo hướng dẫn của nhà cung cấp, ví dụ kit E.Z.N.A blood DNA Mini Kit.

ADN sau khi chiết được điện di trên gel agarosa nồng độ 0,7% và pha trong đệm TAE. Nồng độ ADN thu được sau khi điện di được đo mật độ quang ở các bước sóng 260 nm và 280 nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số. Các mẫu có chất lượng tốt sẽ cho băng điện di sáng và có một băng duy nhất. Nồng độ ADN tổng số được sử dụng làm mẫu với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,134 µg/ml đến 2,945 µg/ml. Theo các phương án thay thế, ADN tinh sạch có thể được định lượng bằng các thiết bị chuyên dụng, ví dụ thiết bị Eppendorf Bio Photometer Plus.

Trong bước chuẩn bị phản ứng PCR, tiến hành chuẩn bị các thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 0,134 µg/ml đến 2,945 µg/ml; dNTP 2 mM với nồng độ 0,2 mM; đệm MgSO₄ 10X với nồng độ 1X. Mỗi xuôi 10 mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3 mM. Mỗi ngược 10 mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3 mM. Pfu ADN polymeaza 2,5 u/µl với nồng độ 0,05 u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl.

Để nhân đặc hiệu đoạn gen chứa rs28364072 của gen *FCER2* chứa, cặp mỗi đặc hiệu được thiết kế có trình tự sau:

mỗi xuôi: 5'-TCATAGCTCCAGCAGAGAACAC-3' (SEQ ID NO.1)

mỗi ngược: 5'-GCCAAGACTCACCTTCTAATCT-3' (SEQ ID NO.2)

để nhân đoạn gen có kích thước 818 bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 với vị trí đa hình cần kiểm tra ở vị trí nucleotit 306, tương ứng rs28364072 của gen *FCER2*. Đoạn mỗi đặc hiệu được thiết kế đặc hiệu cho vị trí rs28364072 của gen *FCER2*.

Trong bước nhân đoạn gen *FCER2* mong muốn, tiến hành phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 64 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút.

Trong bước thu sản phẩm phản ứng PCR, tiến hành điện di trên gel agarosa 1%

trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 60V trong 60 phút thu được băng kích thước 818 bp chứa vùng đa hình rs28364072 của gen *FCER2*. Đoạn gen được nhân có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3.

Trong bước xác định tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2*, tiến hành tinh sạch 20 µl sản phẩm PCR kích thước 818 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* này. Quá trình này được xác định dựa vào các ảnh thu được của quá trình giải trình tự, từ đó xác định được đa hình rs28364072 của gen *FCER2*.

Tùy vào kết quả thu được, có thể xác định được tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* tại vị trí nucleotit 306, các đa hình có thể thuộc các trường hợp đồng hợp kiểu đại TT, dị hợp TC, đồng hợp đột biến CC.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân tích tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* trên mẫu bệnh phẩm

Để phân tích tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* trên các mẫu bệnh phẩm, tiến hành phân tích mẫu bệnh phẩm thu được từ 40 bệnh nhân nhi bệnh hen phế quản có độ tuổi từ 6 đến 16 tuổi đang điều trị tại Bệnh viện Nhi trung ương. Mẫu máu phân tích có thể tích từ 1 đến 2 ml được giữ trong ống chuyên dụng chứa chất chống đông là EDTA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho các phân tích gen.

Từng mẫu máu được tan đông ở nhiệt độ phòng, tiếp đó chuyển 250 µl mẫu vào ống ly tâm vô trùng rồi thêm 25 µl dung dịch proteaza OB và 250 µl đệm BL. Trộn đều trong 10 giây và ủ 65°C trong 5 phút, tiếp đó trộn đều trong 15 giây và ủ 65°C trong 5 phút. Bổ sung 260 µl etanol 100% và trộn đều trong 20 giây rồi ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 15 giây để đảm bảo mẫu không dính trên thành và nắp ống.

Chèn HiBind ADN Mini Column vào ống Collection Tube 2ml (E.Z.N.A blood DNA Mini kit) rồi chuyển toàn bộ mẫu vào cột (để pipet ở mức 790 µl). Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch lọc và ống Collection Tube. Lắp HiBind ADN Mini Column vào Collection Tube 2ml mới rồi thêm 500 µl đệm HBC. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch lọc và sử dụng lại Collection Tube. Thêm 700 µl đệm rửa ADN rồi ly tâm trong 1 phút ở 10.000g, bỏ dịch lọc và sử dụng lại Collection Tube, lặp lại các bước rửa lần 2 với đệm rửa ADN. Ly tâm HiBind ADN Mini Column

14.000 vòng/phút trong 2 phút để làm khô cột. Chuyển HiBind ADN Mini Column vào ống ly tâm 2ml mới rồi bổ sung 100 μ l dung dịch Elution Buffer (đã được làm ấm đến 65°C). Ủ ở 65°C trong 5 phút. Ly tâm tại 14.000 vòng/phút trong 1 phút. Thêm 50 μ l Elution Buffer trong 5 phút ở nhiệt độ phòng rồi ly tâm tại 14.000 vòng/phút trong 1 phút. Sau đó, thu và bảo quản ADN ở -20°C.

Sản phẩm ADN thu được được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di: Nồng độ agarosa sử dụng: 0,7% (0,7 g agarosa pha trong 100 ml đệm TAE 1X). Điện di trên đệm TAE 1X, hiệu điện thế 60 V trong 60 phút. Thể tích mẫu điện di: 5 μ l mẫu + 1 μ l ADN dye 6X; 5 μ l Lambda DNA/HindIII Marker. ADN thu được từ quá trình tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa nồng độ 0,7% pha trong đệm TAE và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 260 nm (OD_{260}), bước sóng 280 nm (OD_{280}) để xác định độ tinh sạch và nồng độ ADN. Kết quả điện di mẫu ADN tổng số của 8 mẫu bệnh nhân được đánh số từ 01 đến 08 được thể hiện trên Hình 1.

Các mẫu ADN tổng số thu được ở trên được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Mỗi mẫu ADN tổng số này được tiến hành các phản ứng PCR riêng có thành phần bao gồm: ADN khuôn có nồng độ 0,134 μ g/ml - 2,945 μ g/ml; dNTP 2 mM với nồng độ 0,2 mM; đệm $MgSO_4$ 10X với nồng độ 1X; mồi xuôi 10 mM với nồng độ 0,3 mM; mồi ngược 10 mM với nồng độ 0,3 mM; Pfu ADN polymeaza 2,5 u/ μ l với nồng độ 0,05 u/ μ l và thêm nước khử ion đến thể tích cuối cùng là 25 μ l. Trong đó, cặp mồi đặc hiệu được thiết kế có trình tự như sau:

mồi xuôi: 5'-TCATAGCTCCAGCAGAGAACAC-3' (SEQ ID NO.1)

mồi ngược: 5'-GCCAAGACTCACCTTCTAATCT-3' (SEQ ID NO.2)

Chu trình PCR được tiến hành như sau: Biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 64 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc: 72 °C trong 5 phút. Sản phẩm PCR thu được có thể được bảo quản ở -20°C hoặc được tinh sạch và giải trình tự.

Sản phẩm ADN thu được được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di. Sản phẩm PCR nhân vùng chứa rs28364072 của đoạn gen *FCER2* khi điện di cho băng 818 bp như được thể hiện trên Hình 2.

Lấy 20 μ l sản phẩm PCR của mỗi băng đặc hiệu và sáng nét được gửi đi tinh

sạch và giải trình tự 2 chiều tại hãng First Base (Malaysia). Kết quả giải trình tự được mở bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, dựa vào các pic thu được để xác định các đa hình rs28364072 của gen *FCER2*. Kết quả được thể hiện trên Hình 3. Trong số 40 bệnh nhân, có 18 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp kiểu dại TT, 18 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp TC và 4 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp đột biến CC. Tần số của allele đột biến là 0,10, sử dụng chi-square test, ta có $\chi^2 = 0,03$ (bậc tự do $df=1$) và $P\text{-value} = 0,87$.

Căn cứ vào kết quả thấy rằng, với 18 bệnh nhân mang kiểu gen dị hợp TC là những bệnh nhân có khả năng tăng nguy cơ kích phát khi sử dụng ICS và cần được được cân nhắc việc sử dụng liều corticoit thích hợp.

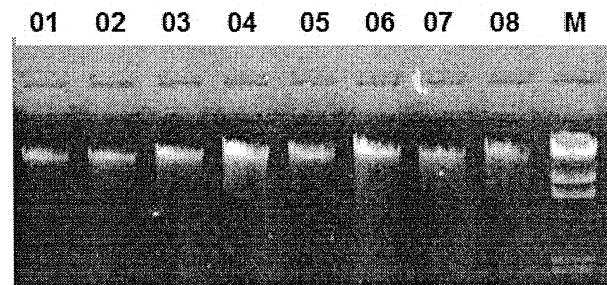
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã xác định được các đa hình rs28364072 của gen *FCER2* với các đột biến TC, TT hoặc CC. Kết quả xác định tính đa hình này được xem là một tiền đề để sàng lọc các bệnh nhân có khả năng đáp ứng tốt thuốc điều trị corticoit.

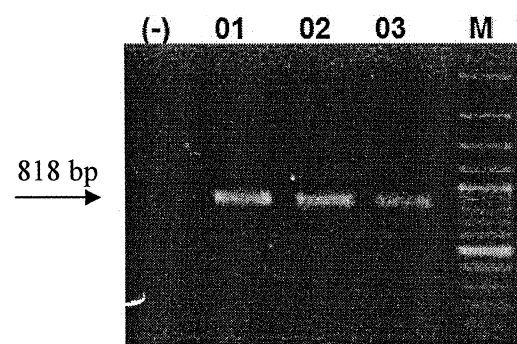
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (*FCER2*), trong đó quy trình bao gồm các bước:
 - a) thu ADN tổng số bằng cách tách chiết ADN từ mẫu máu của trẻ em bị mắc bệnh hen phế quản theo quy trình chuẩn, sau đó điện di trên gel agarosa nồng độ 0,7% pha trong đệm TAE và đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm và 280nm để xác định độ tinh sạch và định lượng ADN tổng số với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,134µg/ml đến 2,945µg/ml;
 - b) chuẩn bị phản ứng PCR với thành phần phản ứng bao gồm: ADN khuôn có nồng độ từ 0,134µg/ml đến 2,945µg/ml; dNTP 2mM với nồng độ 0,2mM; đệm MgSO₄ 10X với nồng độ 1X; mỗi xuôi 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với nồng độ 0,3mM; mỗi ngược 10mM có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 với nồng độ 0,3mM; Pfu polymeaza 2,5u/µl với nồng độ 0,05u/µl và nước khử ion đến thể tích cuối là 25 µl;
 - c) nhân đoạn gen *FCER2* mong muốn bằng cách thực hiện phản ứng PCR với chu trình bao gồm biến tính: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ: 95 °C trong 30 giây, 64 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 5 phút;
 - d) thu sản phẩm phản ứng PCR bằng cách điện di trên gel agarosa 1% trong đệm TAE 1X với hiệu điện thế 60V trong 60 phút thu được băng kích thước 818 bp chứa vùng đa hình rs28364072 của gen *FCER2*; và
 - e) xác định tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* bằng cách tinh sạch 20µl sản phẩm PCR kích thước 818 bp và giải trình tự đoạn gen này để xác định về tính đa hình rs28364072 của gen *FCER2* này.

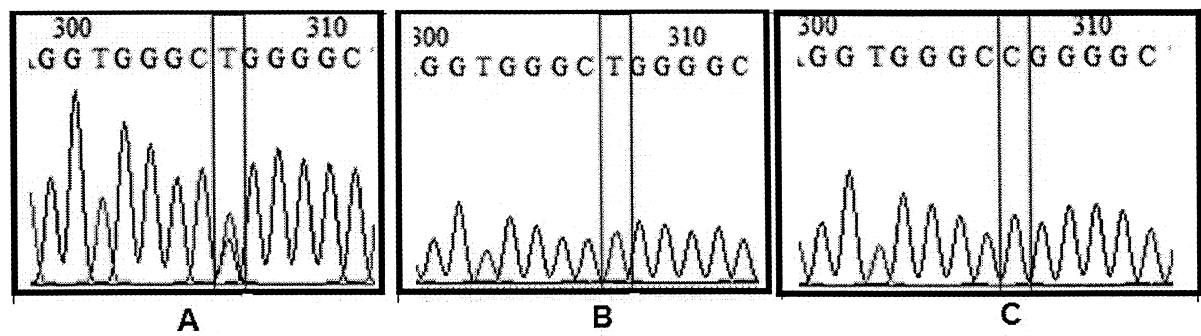
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội (ĐHQGHN)
- <120> Quy trình phân tích đa hình rs28364072 của gen mã hóa thụ thể gắn với IgE ái lực thấp (FCER2)
- <130>
- <160> 3
- <170>
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 1
- TCATAGCTCCAGCAGAGAACAC
- <210> 2
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 2
- GCCAAGACTCACCCCTTCTAATCT
- <210> 3
- <211> 818
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <400> 3
- TCATAGCTCC AGCAGAGAAC ACAGCCCGTG AGGCTGTCTG TTAGGCCCTG GGGTGGGTCT 60
- GCTTTTAGCC GGGACCCAG GAGTGGCCCT AGGAGGGTG CTGCCACCTA GTCTGCCAG 120
- GGTGCCCAAG GCACTTCCAT TGGCCCCACC CCCGAGCCTC TCCTCCACCC CAGGCTTTGT 180
- GTGCAACACG TGCCCTGAAA AGTGGATCAA TTTCCAACGG AAGTGCTACT ACTTCGGCAA 240
- GGGCACCAAG CAGTGGGTCC ACGCCCGGTA TGCCTGTGAC GACATGGAAG GGCAGCTGGT 300

CAGCATCCAC AGCCCGGAGG AGCAGGTGGG CTGGGGCTCT GCAGAGGTGG TGGGCAGCAT 360
 GGCGAGGGTG GGGGGACCCC CACCCCCTC TACCCAACCT CTCGAAGTGG GCTGGAAGGC 420
 CCCGGGCACA TGTCTCCAGT CCTCCAGCCC TGTCTGTCC CCCAGGACTT CCTGACCAAG 480
 CATGCCAGCC ACACCGGCTC CTGGATTGGC CTTCGGAAC TGGACCTGAA GGGGGAGTTT 540
 ATCTGGGTGG ATGGGAGCCA CGTGGACTAC AGGTGAGGAG GGGGCCTCTG GGATCCAGGG 600
 GAGGAGATGG AAATACCGTG GAGGGAGGAG CTCCCTAGAT AAAGTGCATC GGAAAGCGGA 660
 TGAGGGCTCA GAGATAAGGG TCTCTAGGGT GCAGGGGAGA AGGACGCCAG TGGGGGCTGG 720
 GGGACCTGGC CAAGGCTTCT CTGACCTGGA GGAGGGGATA TAGAGGAAGG GGCTCAGGGA 780
 GGAAGTTCCA TGCACAGATT AGAAGGGTGA GTCTTGGC 818