



(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)



2-0002381

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00072

(22) 09/03/2016

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/09/2017 354A

(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) Võ Thị Thương Lan (VN).

(54) QUY TRÌNH THỰC HIỆN PHẢN ỨNG ARMS-PCR ĐA MỖI ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỒNG
THỜI 4 LOẠI ĐỘT BIẾN Ở CÁC MÃ DI TRUYỀN 17, 26, 41/42 VÀ 95 CỦA GEN
BETA GLOBIN GÂY BỆNH THIẾU MÁU BETA THALASSEMIA

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình thực hiện ứng PCR đa mẫu để phát hiện 4 loại đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 trên gen *beta globin* bao gồm các bước: a) Thiết kế mẫu cho phản ứng ARMS-PCR đa mẫu đặc hiệu cho nucleotit đột biến xảy ra trên gen *beta globin* sử dụng phần mềm thiết kế truy cập miễn phí trên internet và dựa vào trình tự nucleotit từ vị trí 62.041 đến 62.820 của gen *beta globin* (HBB) mã số U01317.1 trong ngân hàng dữ liệu DataBank; và b) Thực hiện phản ứng PCR bằng cách kết hợp tất cả các mẫu với nhau trong cùng một phản ứng ARMS-PCR đa mẫu. Quy trình này đã thiết kế được các mẫu đặc hiệu để sử dụng trong phản ứng PCR đa mẫu nhằm mục đích sàng lọc được người mang gen *beta globin* bị đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 trong cùng một phản ứng PCR. Việc sử dụng các mẫu này trong một phản ứng giúp tiết kiệm chi phí và thời gian, thao tác đơn giản có độ ổn định cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sản phẩm thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình thực hiện phản ứng PCR đa môi để phát hiện 4 loại đột biến ở các mã di truyền (codon) 17, 26, 41/42 à 95 trên gen *beta globin* (ARMS-PCR đa môi). Quy trình này được áp dụng để sàng lọc người lành mang gen bệnh và xác định đột biến ở bệnh nhân bệnh thiếu máu beta thalassemia.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh nhân bệnh thiếu máu beta thalassemia là do có đột biến trên gen *beta globin*, gen mã hóa cho chuỗi peptit beta globin; chuỗi này kết hợp với chuỗi anpha globin để tạo nên phân tử hemoglobin có chức năng vận chuyển oxy. Đến nay, hơn 150 đột biến điểm ở gen này đã được ghi nhận ở các nước trên thế giới. Hầu hết đột biến trên gen *beta globin* đều là các đột biến điểm (thay thế/thêm/mất một/vài nucleotit). Điều đặc biệt, tần suất phân bố hay tỷ lệ các loại đột biến phụ thuộc vào vùng địa lý lãnh thổ, vào các dân tộc, chủng người khác nhau. Điều này có nghĩa, việc lựa chọn các đột biến hay xảy ra, rồi tiếp đến là các đột biến ít gặp hơn sẽ tùy thuộc vào từng quốc gia trong chiến lược sàng lọc nhanh và chẩn đoán bệnh thiếu máu beta thalassemia.

Đột biến điểm có thể xảy ra trên 1 alen (đột biến dị hợp) hoặc cả 2 alen (đột biến đồng hợp) của một gen. Kỹ thuật hiện nay được sử dụng rất phổ biến để phát hiện đột biến gen *beta globin* là kỹ thuật ARMS (Amplification Refractory Mutation system) – PCR (tạm dịch là ARMS-PCR đơn môi). Nguyên tắc của kỹ thuật này là sử dụng các cặp môi đặc hiệu cho từng loại alen: alen bình thường và alen đột biến. Khi chỉ sử dụng cặp môi đặc hiệu cho alen đột biến thì sẽ phát hiện được người mang alen đột biến. Khi sử dụng các cặp môi đặc hiệu cho hai alen (bình thường và đột biến) thì sẽ xác định được trạng thái đồng hợp – dị hợp. Thực tế, có thể kết hợp nhiều cặp môi, mỗi cặp môi đặc hiệu cho một đột biến, để xác định được loại đột biến của từng mẫu bệnh phẩm khi phân tích đồng thời cho nhiều mẫu bệnh phẩm. Lúc đó, kỹ thuật được gọi là MARMS (Multiplex ARMS) - PCR (tạm dịch là ARMS-PCR đa môi). Sản phẩm của kỹ thuật ARMS-PCR đa môi là tổ hợp của các băng ADN có kích thước khác nhau, mỗi băng sẽ tương ứng với một loại đột biến. Sản phẩm ARMS-PCR đa môi dễ dàng quan sát bằng kỹ thuật điện di trên gel agarosa và nhuộm gel với ethidium bromua.

Hiện nay đã có nhiều công bố về các môi dùng để xác định các loại đột biến trong phản ứng ARMS-PCR đơn môi. Tuy nhiên, việc phối hợp các môi này với nhau trong phản ứng ARMS-PCR đa môi không phải lúc nào cũng thực hiện được do các lý do sau:

- Các môi cần có giá trị T_m phù hợp với nhau
- Các môi không được có trình tự bổ sung với nhau, đặc biệt ở đầu 3'
- Các băng ADN cần có kích thước khác biệt nhau để quan sát được rõ trên gel điện di nhưng sự sai khác không quá lớn để dễ dàng khuếch đại trong cùng điều kiện PCR.

Ở Việt Nam, các đột biến gen *beta globin* được phát hiện nhờ áp dụng các quy trình của quốc tế. Kết quả nghiên cứu cho thấy 4 loại đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 xảy ra với tỷ lệ cao nhất trong số các đột biến trên gen *beta globin* đã được phát hiện ở bệnh nhân Việt nam mắc bệnh beta thalassemia.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục các nhược điểm nêu trên. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình thực hiện ứng PCR đa môi để phát hiện 4 loại đột biến ở các mã di truyền (codon) 17, 26, 41/42 à 95 trên gen *beta globin* bao gồm các bước sau:

a) Thiết kế môi cho phản ứng ARMS-PCR đa môi

Thiết kế các môi đặc hiệu cho nucleotit đột biến xảy ra trên gen *beta globin* sử dụng phần mềm thiết kế truy cập miễn phí trên internet. Các môi đặc hiệu cho đột biến điểm được thiết kế dựa vào trình tự nucleotit của một sợi ADN trên gen *beta globin* và có nucleotit tận cùng đầu 3' giống hệt hoặc bổ sung với nucleotit đột biến. Đối với đột biến mất vài nucleotit, môi phát hiện đột biến được thiết kế không chứa nucleotit đã bị mất.

Thiết kế một môi, kí hiệu Control-1, theo nguyên tắc dựa vào trình tự nucleotit của sợi ADN bổ sung với sợi được dùng để thiết kế các môi đặc hiệu đột biến. Mục đích thiết kế: Môi Control-1 kết hợp với các môi đặc hiệu cho đột biến nêu trên sẽ khuếch đại các đoạn ADN có kích thước khác nhau trong cùng một phản ứng PCR.

Thiết kế một môi nội chuẩn, kí hiệu Control-2, theo nguyên tắc phải dựa vào trình tự sợi ADN đã sử dụng để thiết kế các môi đặc hiệu cho đột biến nêu trên. Mục đích thiết kế: Cặp môi Control-1/Control-2 được sử dụng để (1) khuếch đại toàn bộ đoạn gen *beta globin* có chứa các mã di truyền cần xác định đột biến; (2) sử dụng như

cặp môi nội chuẩn để kiểm tra sự có mặt của gen *beta globin* trong mẫu ADN cần phân tích và khẳng định các thành phần của phản ứng ARMS-PCR đều có hoạt tính.

Chú ý: Các môi được thiết kế có giá trị nhiệt độ nóng chảy (T_m) cao nhằm mục đích tăng khả năng gắn đặc hiệu giữa môi với khuôn. Giá trị T_m của các môi không sai khác nhau quá 3°C đảm bảo khả năng gắn của từng môi với khuôn xảy ra như nhau.

b) Thực hiện phản ứng PCR: Kết hợp tất cả các môi với nhau trong cùng một phản ứng ARMS-PCR đa môi, sử dụng khuôn là ADN tách từ mẫu sinh phẩm. Sản phẩm ARMS-PCR được điện di trên gel agarosa và nhuộm ethidium bromua.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1 : Sơ đồ vị trí các môi trên đoạn gen *beta globin*. ATG là mã khởi đầu, mã cho axit amin methyonin. Lưu ý nucleotit đầu 3' của các môi CD-M tương ứng với nucleotit đột biến.

Hình 2: Trình tự nucleotit từ vị trí 62 041 đến 62 820 của gen *beta globin* (HBB) (mã số U01317.1). Trình tự nucleotit màu đỏ là trình tự của các môi. Môi Control-2 và các môi đặc hiệu đột biến được thiết kế theo trình tự bổ sung (chiều mũi tên ngược). Các nucleotit đánh dấu màu xanh da trời là vị trí đột biến thay thế ở mã di truyền 17, 26, màu vàng là đột biến mất nucleotit ở mã di truyền 41/42, màu xanh lá cây là vị trí mã di truyền 95 có chèn nucleotit A (mũi tên đen).

Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm ARMS-PCR đa môi trên gel agarosa 2%. Giếng M: Mẫu ADN của người khỏe mạnh không có đột biến trên gen *beta globin*. Giếng (-): Đối chứng âm không có ADN khuôn. Giếng C: ADN phối trộn của 2 mẫu số 1+48 theo tỷ lệ 1:1. Giếng 1-4: Mẫu ADN của bệnh nhân mắc bệnh thiếu máu thalassemia. Giếng L: thang chuẩn ADN 100 bp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

a) Thiết kế môi cho phản ứng ARMS-PCR đa môi

Dựa vào trình tự nucleotit của gen *beta globin* (HBB) có trong ngân hàng dữ liệu DataBank (mã số U01317.1) để xác định vị trí các mã di truyền liên quan. Đặc điểm của 4 đột biến xảy ra trên ở mã di truyền 17, 26, 42/42 và 95 trên gen *beta globin* như sau:

- Đột biến điểm thay thế Adenin (A) thành Tyrosin (T) xảy ra ở mã di truyền 17 khiến AAG biến đổi thành TAG và làm xuất hiện mã dừng tổng hợp protein beta globin .

- Đột biến điểm thay thế Guanin (G) thành Adenin (A) xảy ra ở mã di truyền 26 khiến GAG biến đổi thành AAG và làm xuất hiện vị trí cắt nối exon-intron bất thường nên sợi mARN bình thường không được hình thành.

- Đột biến mất 4 nucleotit (TCTT) xảy ra ở cả 2 mã di truyền 41 và 42 làm dịch chuyển khung đọc trong quá trình dịch mã khiến cho protein beta globin không được tổng hợp.

- Đột biến điểm thêm Adenin (A) xảy ra ở mã di truyền 95 làm dịch chuyển khung đọc trong quá trình dịch mã khiến cho protein beta globin không được tổng hợp.

Vị trí lựa chọn để thiết kế các môi cần đảm bảo:

- Các môi đặc hiệu cho 3 đột biến điểm ở mã di truyền 17, 26 và 95 phải đảm bảo có nucleotit cuối cùng đầu 3' bổ sung với nucleotit đột biến. Ví dụ đột biến điểm thay thế Guanin (G) thành Adenin (A) ở mã di truyền 26 thì đầu tận cùng 3' của môi phải là nucleotit T. Môi thiết kế đặc hiệu cho đột biến ở 2 mã di truyền 41/42 phải không chứa 4 nucleotit (TCTT).

- Môi Control-1 phải nằm trước mã di truyền 17; vị trí lựa chọn để thiết kế môi Control-2 phải nằm sau mã di truyền 95. Như vậy hai môi này cách xa nhau nhất và chứa toàn bộ cả 4 mã di truyền quan tâm. Trình tự của hai môi này phải được lấy từ trình tự của hai sợi ADN bổ sung ngược chiều nhau của gen *beta globin*.

- Môi Control-1 được thiết kế phải đảm bảo tạo cặp với từng môi đột biến để khuếch đại được các băng ADN có kích thước lớn hơn 150 bp và kích thước các băng ADN này phải sai khác nhau ít nhất 10 bp. Đáp ứng yêu cầu này sẽ cho phép quan sát được rõ ràng sản phẩm ARMS-PCR đa môi trên gel agarosa (kích thước nhỏ hơn 150 bp và sai khác nhau ít hơn 10 bp sẽ không thích hợp với loại gel này)

Sử dụng chương trình FastPCR tra cứu miễn phí (<http://fast-pcr.software.informer.com/6.2/>) để thiết kế môi. Các môi đặc hiệu cho đột biến và môi Control-2 được thiết kế dựa vào trình tự của một sợi ADN của gen *beta globin*; riêng môi Control-1 được thiết kế dựa vào trình tự sợi ADN bổ sung. Chiều dài (số nucleotit) của từng môi được chọn thỏa mãn: (1) đảm bảo cho giá trị Tm tính theo 5 phương pháp (có trong chương trình FastPCR) đều lớn hơn 55°C và (2) giá trị Tm của tất cả các môi không chênh lệch nhau quá 3°C. Điều này cho phép các môi gắn đặc hiệu với khuôn và khả năng gắn của từng môi với khuôn xảy ra như nhau. Môi đặc hiệu cho đột biến được kí hiệu theo mã di truyền bị đột biến tiếp theo là chữ M (mutant). Ví dụ môi đặc hiệu cho đột biến xảy ra ở mã di truyền 17 sẽ được gọi là CD17M.

Sơ đồ vị trí của các môi trên gen *beta globin* được minh họa trên Hình 1. Các môi được đặt mua từ các hãng sản xuất (IDT, Sigma, Invitrogen,...) và được cung cấp dưới dạng đông khô. Các môi được pha về nồng độ gốc 100 μ M theo hướng dẫn chi tiết trong đơn giao hàng và được bảo quản ở - 20°C.

b) Thực hiện phản ứng PCR

Tách chiết ADN từ mẫu sinh phẩm (của người khỏe mạnh hoặc bệnh nhân bệnh thalassemia). Mẫu sinh phẩm được sử dụng là mẫu máu. Lượng máu và quy trình tách chiết ADN từ máu tuân thủ đúng hướng dẫn của các hãng sản xuất bộ sinh phẩm. Trong quy trình này sử dụng kit QIAamp ADN Mini Kit của Qiagen.

Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm (OD_{260}); độ sạch của ADN được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Các giá trị OD được đo trên máy đo NanoDrop. Khi tỷ lệ này dao động từ 1,8 đến 2,0 thì ADN đủ chất lượng cho phản ứng PCR. Căn cứ vào giá trị OD_{260} để tính nồng độ ADN theo công thức sau:

$$[ADN] = OD_{260} \times n \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Trong đó OD_{260} : độ hấp thụ của ADN ở bước sóng 260 nm

n : số lần pha loãng mẫu

50 : nồng độ ADN ứng với $OD_{260} = 1$.

Sử dụng nước cất 2 lần đã khử trùng để pha loãng ADN. Tất cả ADN được bảo quản ở - 20°C.

Kết hợp tất cả các môi với nhau trong cùng một phản ứng ARMS-PCR đa môi, sử dụng khuôn là ADN tách từ mẫu sinh phẩm. Hóa chất cho phản ứng PCR có thể sử dụng Master Mix hoặc các hóa chất riêng lẻ cung cấp bởi các hãng thương mại (Promega, Qiagen, NEB,...). Nếu sử dụng Master Mix (đã gồm đủ thành phần cơ bản của phản ứng PCR: dNTPs, Taq polymeraza, đệm cho enzym) chỉ cần thêm ADN khuôn và các môi đặc hiệu để khuếch đại các băng ADN. Nếu sử dụng các hóa chất riêng lẻ, cần tuân thủ đúng hướng dẫn sử dụng của Hãng sản xuất khi chuẩn bị phản ứng. Tất cả các ống được giữ lạnh trên đá trước khi bổ sung ADN khuôn và các môi đặc hiệu. Thể tích cuối cùng của phản ứng thay đổi từ 10-15 μ l (không nên nhiều hơn để tiết kiệm các hóa chất), trong đó có 10-20 ng ADN khuôn và nồng độ các môi thay đổi từ 0,3 μ M đến 1,0 μ M. Sản phẩm ARMS-PCR được điện di trên gel agarosa và nhuộm ethidium bromua.

Gen *beta globin* chỉ có 1 bản copy trong hệ gen, nằm trên nhiễm sắc thể số 11 mã hóa cho chuỗi protein β globin. Hầu hết các đột biến xảy ra trên gen này gây ra bệnh thiếu máu beta thalassemia là các đột biến điểm. Kỹ thuật ARMS-PCR được sử dụng rộng rãi để phát hiện các đột biến điểm. Vị trí của các mối (CD-M) phát hiện 4 đột biến xảy ra phổ biến ở người Việt Nam được mô tả trên Hình 1.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Quy trình mà giải pháp hữu ích đề xuất được áp dụng để thiết kế các mối và sử dụng chúng trong cùng một phản ứng ARMS-PCR đa mối để phát hiện người mang gen *beta globin* bị đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95. Quy trình này gồm các bước chi tiết như sau:

a) Thiết kế mối cho phản ứng ARMS-PCR đa mối

Sử dụng chương trình FastPCR để thiết kế các mối dựa vào trình tự nucleotit từ vị trí 62.041 đến 62.820 của gen *beta globin* (HBB) mã số U01317.1 trong ngân hàng dữ liệu DataBank.

Mỗi Control-1 được thiết kế theo đúng trình tự đã chọn ở trên nhưng các mối đặc hiệu với đột biến và mỗi Control-2 được thiết kế dựa vào trình tự bổ sung. Số nucleotit của từng mối được lựa chọn sao cho giá trị T_m của các mối này đều cao hơn 55°C và không sai khác nhau quá 3°C.

- Mỗi đặc hiệu để phát hiện đột biến điểm thay thế mã di truyền 17 (AAG) thành (TAG) có đầu tận cùng 3' là A.

- Mỗi đặc hiệu để phát hiện đột biến điểm thay thế mã di truyền 26 (GAG) thành (AAG) có đầu tận cùng đầu 3' là T.

- Mỗi đặc hiệu để phát hiện đột biến mất (TCTT) ở 2 mã di truyền 41/42 có đầu 3' không chứa AAGA.

- Mỗi đặc hiệu để phát hiện đột biến thêm nucleotit A làm dịch khung đọc tại mã di truyền 95 (AAG) thành (AAA) có đầu tận cùng đầu 3' là T.

Vị trí các mối được trình bày trong Hình 2. Trình tự nucleotit và giá trị T_m của các mối tính theo chương trình FastPCR được trình bày trong Bảng 1. Kích thước các đoạn ADN khuếch đại bởi các cặp mối trong cùng một phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 2.

Các mối được đặt mua từ Hãng IDT (Mỹ). Mối ở dạng đông khô. Sử dụng nước cất hai lần khử trùng để pha loãng mối về nồng độ 100 μ M theo hướng dẫn chi tiết của hãng sản xuất. Mối được bảo quản ở -20°C.

Từ nồng độ gốc 100 μM , các môi tiếp tục được pha loãng về nồng độ thích hợp bằng nước cất hai lần khử trùng. Sau khi pha loãng, các môi được bảo quản ở -20°C . Công thức pha môi được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 1: Trình tự nucleotit và giá trị T_m của các môi được tính toán theo chương trình FastPCR. Các nucleotit đánh dấu là những nucleotit đột biến (thay thế hoặc thêm vào)

Môi	Trình tự	Các giá trị T_m tính theo 5 công thức (FastPCR)
Control-1	SEQ ID NO:1	$T_m = 59,3^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 64,6^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 60,1^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,6^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 58,6^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)
Control-2	SEQ ID NO:12	$T_m = 59,0^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 65,7^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 61,2^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,5^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 59,3^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)
CD17M	SEQ ID NO:3	$T_m = 60,6^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 64,8^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 59,7^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,5^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 59,5^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)
CD26M	SEQ ID NO:4	$T_m = 63,1^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 65,2^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 65,5^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,6^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 58,6^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)
CD41/42M	SEQ ID NO:5	$T_m = 60,4^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 64,3^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 62,0^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,5^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 59,3^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)
CD95M	SEQ ID NO:6	$T_m = 61,3^{\circ}\text{C}$ (Allawi's thermodynamics parameters) $T_m = 67,1^{\circ}\text{C}$ (Sugimoto's thermodynamics parameters) $T_m = 61,2^{\circ}\text{C}$ (SantaLucia's thermodynamics parameters) $T_m = 60,5^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 75,1 + 11,7\text{Log}[K+] + 0,41(\text{GC}\%) - 528/\text{L}$) $T_m = 59,3^{\circ}\text{C}$ ($T_m = 64,9 + 41(\text{nG} + \text{nC} - 16,4)/\text{L}$)

Bảng 2: Kích thước các băng ADN được khuếch đại trong phản ứng ARMS-PCR đa môi để phát hiện đồng thời các đột biến

Cặp môi	Mục đích sử dụng	Kích thước sản phẩm (bp)
Control-1/Control-2	Nội chuẩn	714
Control-1/CD17M	Phát hiện đột biến CD17	205
Control-1/CD26M	Phát hiện đột biến CD26	226
Control-1/CD41/42M	Phát hiện đột biến CD41/42	410
Control-1/CD95M	Phát hiện đột biến CD95	559

Bảng 3: Chuẩn bị nồng độ các môi thích hợp cho phản ứng ARMS-PCR

Môi	Thể tích môi gốc 100 μ M (μ l)	Thể tích H ₂ O (μ l)	Nồng độ môi cuối cùng (μ M)
Control-1	10	90	10,0
CD17M	5	495	1,0
CD26MR	5	495	1,0
CD41/42MR	5	195	2,5
CD95MR	5	195	2,5
Control-2	5	95	5,0

b) Thực hiện phản ứng PCR

Sử dụng 2xGotaqMaster Mix (đã đủ thành phần cơ bản của phản ứng PCR: dNTPs, Taq polymeraza, đệm cho enzym) cung cấp bởi hãng thương mại Promega (Code M7122). Chuẩn bị phản ứng có tổng thể tích là 15 μ l theo hướng dẫn trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4: Thành phần và điều kiện phản ứng ARMS-PCR đa môi để phát hiện đồng thời cả 4 loại đột biến

Thành phần	Thể tích (μ l)	Điều kiện
H ₂ O	3,1	94°C trong 5' - Lặp lại 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm (94°C 30'', 68°C 20'', 72°C 15'') 72°C trong 5'.
2x Gotaq Master Mix	7,5	
Control-1 10 μ M	1,0	
CD17 M 1 μ M	0,7	
CD26 M 1 μ M	0,4	
CD41/42 M 2,5 μ M	0,3	
CD95 M 2,5 μ M	0,6	
Control-2 5 μ M	0,4	
ADN (20 ng)	1,0	
Tổng	15,0	

Sản phẩm ARMS-PCR đã môi được điện di trên gel agaroza 2% (Hiện thị trong Hình 3). Sự có mặt của các băng ADN với kích thước trình bày trong Bảng 2 cho phép kết luận có đột biến. Các mẫu số 3 và số 7 không chứa đột biến, các mẫu còn lại có 1 hoặc hai loại đột biến.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

- Các môi được thiết kế đều có giá trị T_m cao và không sai khác nhau quá 3°C đảm bảo tính đặc hiệu, khả năng gắn của các môi vào khuôn và các đoạn ADN được khuếch đại xảy ra như nhau.
- Kết hợp của môi Control-1 với các môi đặc hiệu đột biến đảm bảo khuếch đại các băng ADN cho phép xác định từng loại đột biến.
- Kết hợp của môi Control-1 với Control-2 khuếch đại băng ADN được xem là nội chuẩn xác nhận chất lượng ADN khuôn và các thành phần của phản ứng PCR đều tốt.
- Phản ứng ARMS-PCR đã môi cho phép phát hiện đồng thời 4 loại đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 ở người lành màng gen bệnh hoặc ở các bệnh nhân chẩn đoán mắc bệnh thiếu máu beta thalassemia.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình thực hiện ứng PCR đa môi để phát hiện 4 loại đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 trên gen *beta globin* bao gồm các bước:

a) Thiết kế môi cho phản ứng ARMS-PCR đa môi

Thiết kế các môi đặc hiệu cho nucleotit đột biến xảy ra trên gen *beta globin* sử dụng phần mềm thiết kế truy cập miễn phí trên internet và dựa vào trình tự nucleotit từ vị trí 62 041 đến 62 820 của gen *beta globin* (HBB) mã số U01317.1 trong ngân hàng dữ liệu DataBank; trong đó các môi thiết kế được có các thông số như sau:

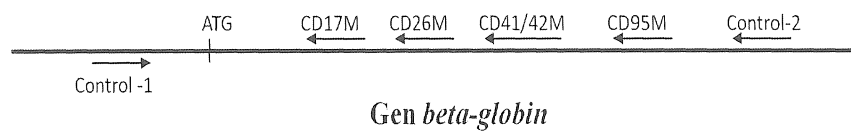
Môi	Trình tự	Giá trị T _m tính theo 5 công thức (FastPCR)
Control-1	SEQ ID NO:1	T _m = 59,3°C T _m = 64,6°C T _m = 60,1°C T _m = 60,6°C T _m = 58,6°C
Control-2	SEQ ID NO:12	T _m = 59,0°C T _m = 65,7°C T _m = 61,2°C T _m = 60,5°C T _m = 59,3°C
CD17M	SEQ ID NO:3	T _m = 60,6°C T _m = 64,8°C T _m = 59,7°C T _m = 60,5°C T _m = 59,5°C
CD26M	SEQ ID NO:4	T _m = 63,1°C T _m = 65,2°C T _m = 65,5°C T _m = 60,6°C T _m = 58,6°C
CD41/42M	SEQ ID NO:5	T _m = 60,4°C T _m = 64,3°C T _m = 62,0°C T _m = 60,5°C T _m = 59,3°C
CD95M	SEQ ID NO:6	T _m = 61,3°C T _m = 67,1°C T _m = 61,2°C T _m = 60,5°C T _m = 59,3°C

và

b) Thực hiện phản ứng PCR: Kết hợp tất cả các môi với nhau trong cùng một phản ứng ARMS-PCR đa môi, sử dụng khuôn là ADN tách từ mẫu sinh phẩm; thể tích phản ứng từ 10 đến 15 µl; chu trình phản ứng bao gồm: 94°C trong 5 phút; lặp lại 40 chu

kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm (94°C 30 giây, 68°C 20 giây, 72°C 15 giây); 72°C trong 5 phút; Sản phẩm ARMS-PCR được điện di trên gel agaroza và nhuộm ethidium bromua.

Hình 1



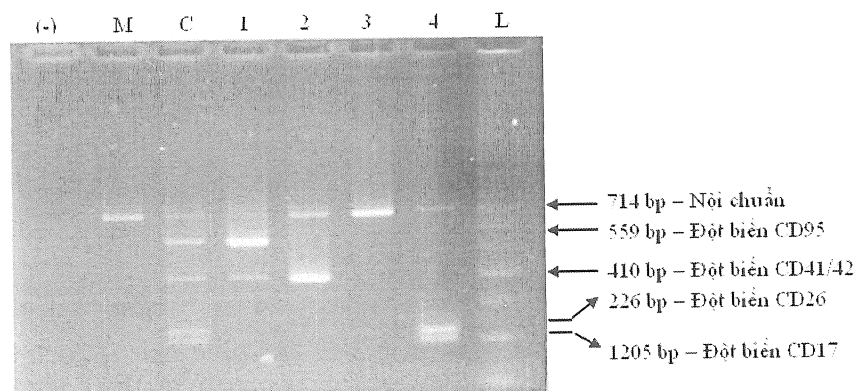
Hình 2

```

62041 gagccacacc ctagggttgg ccaatctact cccaggagca gggagggcag gagccagggc
Control-1
62101 tgggcataaa agtcagggca gagccatcta ttgcttacat ttgcttctga cacaactgtg
62161 ttacttagga acctcaaacg gacacatggg tgcacgtgac tcttgaggag aagtctgccc
62221 ttactgccct ctgggccaag gtgaacgtgg atgaagttag tggtaggc ctgggcaagg
CD17M CD26M
62281 tggatcaag gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggca tgtggagaca
62341 gagaagactc ttgggtttct gataggcaat gactctctct gccatttggg ctattttccc
62401 acccttaggc tgctgggtgt ctacccttgg acccagaggt tctttgagtc ctttggggat
CD41/42M
62461 ctgtccactc ctgatgtgtt tatgggcaac cctaaggtga aggttcattg caagaagtg
62521 ctgggtgccc ttagtgatgg cctgggtcac ctggagaacc tcaagggcac ctttgcacaa
62581 ctgagtgagc tgcactgtda ctgctgcac gtggatcctg agaaattcag ggtgagicta
CD95M
62641 tgggaacctt gatgttttct ctcccttctt ttctataggt taagtccatg tcataygaag
62701 gggagaagta apagggtaca gtttagaatg ggaacagac gaatgattgc atcaatctag
Control-2
62761 aagtctcagg atcgtttttag tttcttttat ttgcgttca taacaattgt tttctttctt

```

Hình 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)

<120> Quy trình thực hiện phản ứng ARMS-PCR đa môi để phát hiện đồng thời 4 loại đột biến ở các mã di truyền 17, 26, 41/42 và 95 của gen *beta globin* gây bệnh thiếu máu beta thalassemia.

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mọi

<400> 1

ccaatctactcccaggagcagg

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mọi

<400> 2

cgatcctgagacttcacactgatg

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mọi

<400> 3

ccaccaacttcacacgttcaccta

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mọi

<400> 4

ataccaacctgccagggcctt

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mời

<400> 5

acagatccccaaggactcaacctc

<210> 6

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự tổng hợp nhân tạo

<223> Mời

<400> 6

gtctcaggatccacgtgcagcttt

<210> 7

<211> 780

<212> ADN

<213> Trình tự gen beta globin mã số U1317.1 từ vị trí 62041 đến 62820

<400> 7

```

1 gagccacacc ctagggttgg ccaatctact cccaggagca gggagggcag gagccagggc
61 tgggcataaa agtcagggca gagccatcta ttgcttacat ttgcttctga cacaactgtg
121 ttactagca acctcaaaca gacaccatgg tgcacotgac tcctgaggag aagtctgccg
181 ttactgccct gtggggcaag gtgaacgtgg atgaagttgg tggtgaggcc ctgggcaggt
241 tggatatcaag gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggca tgtggagaca
301 gagaagactc ttgggtttct gataggcact gactctctct gcctattggt ctattttccc
361 acccttaggc tgctggtggt ctacccttgg acccagaggt tctttgagtc ctttggggat
421 ctgtccactc ctgatgctgt tatgggcaac cctaagggtga aggctcatgg caagaaagtg
481 ctcggtgcct ttagtgatgg cctggctcac ctggacaacc tcaagggcac ctttgccaca
541 ctgagtgagc tgcactgtga caagctgcac gtggatcctg agaacttcag ggtgagtcta
601 tgggaccctt gatgttttct ttecccttct tttctatggt taagttcatg tcataggaag
661 gggagaagta acaggggtaca gtttagaatg ggaaacagac gaatgattgc atcagtggtg
721 aagtctcagg atcggttttag tttcttttat ttgctgttca taacaattgt tttcttttgt

```