



(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)



1-0028685

(51)<sup>7</sup> C12Q 3/00

(13) B

(21) 1-2014-00585

(22) 20/07/2012

(86) PCT/US2012/047625 20/07/2012

(87) WO 2013/016200 A1 31/01/2013

(30) 61/510,762 22/07/2011 US

(45) 25/06/2021 399

(43) 25/04/2014 313A

(73) Access Bio, Inc. (US)

65 Clyde Road, Suite A, Somerset, New Jersey 08873 (US)

(72) KIM, Hyeon Suk (US); KOO, Tae-Hee (KR); CHOI, Young Ho (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) DẢI DỪNG CHO PHÂN TÍCH SẮC KÝ DÒNG NGANG VÀ PHƯƠNG PHÁP  
PHÂN TÍCH SẮC KÝ SỬ DỤNG DẢI NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dải dừng cho phân tích sắc ký dòng ngang cải tiến với mẫu sinh học trên một mặt phẳng đơn và phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang sử dụng thiết bị phân tích chứa dải này. Dải theo sáng chế bao gồm một tấm đơn mà có thể cải tiến phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang theo hướng đơn giản, dễ thực hiện với khả năng đọc kết quả trực tiếp rõ ràng. Dải theo sáng chế bao gồm vùng đặt mẫu (mẫu) và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được, nơi toàn bộ hỗn hợp phản ứng (chất phản ứng) được đặt trên cùng một mặt phẳng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sắc ký, trong đó hemoglobin được tách ra khỏi chất phân tích bằng phương pháp phân tích vi sai trên pha rắn. Phương pháp phân tích theo sáng chế cho phép loại bỏ hoàn toàn sự cản trở của hemoglobin về khả năng đọc kết quả. Sáng chế hữu ích với quy trình phân tích đơn giản, dễ thực hiện để thu được kết quả nhanh chóng, rõ ràng.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến dải dạng tấm đơn dùng cho phân tích dòng ngang cải tiến và phương pháp phân tích sử dụng dải này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các phân tích được tiến hành tại nơi khám bệnh (Point of Care – POC) đã trở nên phổ biến và trở thành các công cụ chẩn đoán rất hữu ích, không những tại các cơ sở khám chữa bệnh gồm bệnh viện và phòng khám của bác sỹ, mà còn tại các địa điểm lâm sàng khác gồm nơi làm việc hoặc các địa điểm ở vùng xa. Do tính khẩn cấp và mục đích của phân tích, rất cần có thiết bị phân tích đơn giản và hữu hiệu, cũng như phương pháp xác định kết quả theo cách giảm chi phí và rút ngắn thời gian. Cụ thể hơn, phân tích tại các cơ sở không phải cơ sở khám chữa bệnh như phân tích bệnh dịch lây truyền nhanh, phân tích tác nhân chiến tranh sinh học trên chiến trường, phân tích chất gây ô nhiễm môi trường, hoặc phân tích tình trạng nghiện ma túy ở nơi làm việc tại những địa điểm lâm sàng ở vùng xa cần được thực hiện một cách đơn giản và dễ dàng. Đôi khi, do các phân tích này thường được thực hiện bởi người không được đào tạo chuyên sâu trong lĩnh vực chẩn đoán lâm sàng, nên các phân tích tại nơi khám như vậy cần phải đơn giản, nhanh và dễ sử dụng. Ngoài ra, các thiết bị phân tích này cần được sử dụng trong môi trường thiếu sự kiểm soát về điều kiện bảo quản như nhiệt độ hoặc độ ẩm. Do đó, lý tưởng là thiết bị phân tích tại nơi khám có mức trang bị tối thiểu và cần có phương pháp phân tích kèm theo thiết bị có khả năng hoạt động ổn định trong môi trường khắc nghiệt bao gồm nhiệt độ hoặc độ ẩm.

Cùng với nhu cầu gia tăng đối với các phân tích tại nơi khám để sử dụng cho nhiều mục đích và môi trường khác nhau đang ngày càng gia tăng, cần có thêm những phương pháp và thiết bị để thực hiện phân tích trên mẫu sinh học theo cách hiệu quả về mặt chi phí và thời gian.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dải dạng tấm đơn dùng cho phân tích dòng ngang, trong đó vùng đặt mẫu (mẫu) và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được

nơi toàn bộ hỗn hợp phản ứng (chất phản ứng) được gắn lên cùng một mặt phẳng của tấm đơn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dải dùng cho phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym đối với một chất phân tích chọn trước bao gồm:

một tấm đơn; và

cơ chất được gắn lên dưới dạng khô.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym đối với một chất phân tích chọn trước, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cung cấp thiết bị phân tích có dải bao gồm:

(i) một tấm đơn; và

(ii) cơ chất được gắn lên dưới dạng khô;

(b) đặt mẫu lên tấm đơn mà cơ chất đã được gắn;

(c) cho mẫu chảy qua tấm phân cắt đơn đến cơ chất;

(d) cho mẫu phản ứng với cơ chất để tạo ra sản phẩm phản ứng; và

(e) nhận biết và diễn giải sản phẩm phản ứng để chỉ ra sự có mặt hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym để phát hiện sự có mặt của glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD) bao gồm các bước:

(a) cung cấp thiết bị phân tích có dải dạng tấm đơn gồm:

(i) một tấm phân cắt đơn đã được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải;

(ii) hỗn hợp phân tích chứa glucoza-6-phosphat, nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) hoặc nicotinamit adenin dinucleotit (NAD), hydrua hoặc chất chuyển điện tử và hỗn hợp của chúng; và

(iii) muối tetrazoli,

(b) cho mẫu lên tấm phân cắt đơn;

(c) cho mẫu chảy qua tấm phân cắt để tiếp xúc với hỗn hợp phân tích;

(d) cho mẫu phản ứng với hỗn hợp phân tích để tạo ra sản phẩm phản ứng; và

(e) nhận biết và diễn giải sản phẩm phản ứng để chỉ ra sự có mặt hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu.

Theo một phương án khác, sáng chế được phát triển dựa trên phân tích có định dạng khô, trong đó mẫu đã cho vào vùng đặt mẫu sẽ di chuyển đến vùng phản ứng nhờ lực mao dẫn, trong khi vùng đặt mẫu và vùng phản ứng nằm trên cùng một mặt phẳng. Chất phản ứng chứa tổ hợp của các thành phần gồm enzym và chế phẩm để gây ra phản ứng tạo màu và được gắn vào dưới dạng khô. Theo sáng chế, mẫu di chuyển đến vùng phản ứng và được kết hợp với chất phản ứng. Khi mẫu được kết hợp với chất phản ứng, chế phẩm tạo ra sẽ di chuyển từ từ và ở lại trên vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được, trong khi các thành phần còn lại trong mẫu, như hemoglobin, sẽ di chuyển nhanh hơn chế phẩm tạo ra và tiếp tục di chuyển để tách ra khỏi chế phẩm mong muốn thu được, ví dụ nhờ lực mao dẫn. Khi phản ứng với mẫu chứa chất phân tích, vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được sẽ thể hiện kết quả trong chất chỉ thị, ví dụ chất chỉ thị màu. Quá trình lưu giữ chế phẩm tạo ra và quá trình di chuyển mao dẫn tiếp tục diễn ra đối với thành phần còn lại trong mẫu sẽ loại bỏ sự cản trở bất kỳ của các thành phần khác, như hemoglobin, và cải thiện khả năng nhận biết kết quả. Mẫu di chuyển nhờ lực mao dẫn trong chất lỏng chứa trong mẫu, như máu, hoặc dung dịch đệm, sẽ được cho vào bổ sung cùng với mẫu này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích chẩn đoán nhanh (Rapid Diagnostic Test - RDT) dưới dạng phân tích có định dạng khô trên dải dạng tấm đơn dùng cho phân tích tại nơi khám. Phương pháp sắc ký bên trên tấm đơn sẽ tạo ra phân tích ổn định với quy trình đơn giản và cho kết quả phân tích nhanh.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký, trong đó hemoglobin được tách ra khỏi chất phân tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký vi sai trên pha rắn. Màu của hemoglobin thường bị cản trở bởi khi quan sát trực tiếp với phản ứng màu của chất phân tích trong hồng cầu. Sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký dòng ngang, trong đó quá trình di chuyển vi sai của mẫu diễn ra do sự khác biệt về kích cỡ, độ nhớt, khả năng kết tủa của chất phân tích với chất phản ứng, sự khác biệt về mức độ tích điện qua nền xốp đã được tẩm các thuốc thử sẽ tương tác với chất phân tích.

Ưu điểm của sáng chế bao gồm khả năng thao tác dễ dàng và đơn giản, dễ dàng quan sát trực tiếp mà không bị cản trở bởi hemoglobin.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

FIG. 1 thể hiện kết cấu của dải dạng một tấm theo sáng chế, so với dải dạng hai tấm thông thường.

FIG.2 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh khả năng quan sát giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường đối với phân tích về tình trạng thiếu G6PD. Cường độ nhận biết màu nhìn thấy được được đo bằng điểm số được thể hiện trên hình vẽ.

FIG.3 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh cường độ tín hiệu giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường sử dụng phân tích enzym để phân tích G6PD. Cường độ nhận biết màu nhìn thấy được được đo bằng điểm số được thể hiện trên hình vẽ.

FIG.4 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh khả năng nhìn thấy được giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường đối với phân tích lactat dehydrogenaza.

FIG.5 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh cường độ tín hiệu giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường sử dụng phân tích enzym để phân tích lactat dehydrogenaza. Cường độ nhận biết màu nhìn thấy được được đo bằng thiết bị đọc aQzen Reader.

FIG.6 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh khả năng nhìn thấy được giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường đối với phân tích về độ cồn.

FIG.7 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh cường độ tín hiệu giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường sử dụng phân tích enzym để phân tích rượu dehydrogenaza. Cường độ nhận biết màu nhìn thấy được được đo bằng thiết bị đọc aQzen Reader.

FIG. 8 thể hiện các kết quả của thử nghiệm so sánh cường độ tín hiệu giữa dải dạng một tấm theo sáng chế so với dải dạng hai tấm thông thường sử dụng phân tích enzym để phân tích lactat dehydrogenaza. Cường độ nhận biết màu nhìn thấy được

được đo bằng điểm số được thể hiện trên hình vẽ.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo sáng chế, các thuật ngữ sau được định nghĩa như dưới đây.

“Vật liệu sinh học”, “mẫu sinh học” hoặc “mẫu” chỉ chất lỏng hoặc mô được lấy từ động vật có xương sống, như máu toàn phần, huyết thanh, huyết tương, nước bọt, nước tiểu, và dịch não tủy.

“Chất phân tích” chỉ một thành phần nhất định trong vật liệu sinh học, mẫu sinh học, hoặc mẫu, thành phần này có hoạt tính đặc hiệu là mục đích của phân tích để nhận biết một trong số các kết quả như sự có mặt, không có mặt, hoặc nồng độ.

Trừ khi có định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng theo sáng chế có nghĩa chung như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực mà sáng chế có liên quan. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và vật liệu thích hợp sẽ được mô tả trong phần dưới đây. Tất cả các tài liệu công bố, đơn yêu cầu cấp patent, patent, và các tài liệu tham khảo khác được đề cập đến ở đây được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ. Trong trường hợp có sự khác biệt, kể cả các định nghĩa được đưa ra trong đó, sẽ được ưu tiên áp dụng theo bản mô tả này. Ngoài ra, các vật liệu, phương pháp, và ví dụ được đưa ra ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các dấu hiệu và lợi ích khác của sáng chế sẽ được mô tả rõ trong phần mô tả chi tiết sáng chế và yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Sáng chế đề xuất dải dùng cho phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym đối với một chất phân tích chọn trước bao gồm:

một tấm đơn; và

cơ chất được gắn lên dưới dạng khô.

Theo một phương án, tấm đơn theo sáng chế là tấm phân cắt đã được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải, như magie clorua.

Theo một phương án khác, chất phân tích được chọn từ protein, hydrat cacbon,

lipit, axit nucleic trong dịch thể từ người và động vật.

Theo một phương án khác, cơ chất được gắn lên dưới dạng khô là hỗn hợp phân tích chứa cơ chất phản ứng đối với chất phân tích, như glucoza-6-phosphat đối với glucoza phosphat dehydrogenaza (G6PD), cơ chất có thể chứa thêm nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP), chất vận chuyển hydrua và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án nhất định, chất phân tích được chọn từ glucoza-6- phosphat dehydrogenaza (G6PD), lactat dehydrogenaza hoặc rượu.

Theo một phương án được ưu tiên, chất phân tích là glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD).

Theo phương án khác, cơ chất chứa chất chỉ thị như hợp chất tạo màu chẳng hạn. Có thể sử dụng nhiều hợp chất có thể được biến đổi, về điện tử hoặc cấu trúc, nhờ quá trình tiếp xúc của cơ chất với chất phân tích, và biểu hiện sự biến đổi này ở dạng bất kỳ có thể quan sát trực tiếp hoặc bằng cách dùng phương pháp hoặc thiết bị đo, mà không bị giới hạn cụ thể. Các ví dụ về hợp chất như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất tạo màu. Các hợp chất biểu hiện các màu khác nhau thường biến đổi màu nhờ quá trình biến đổi trạng thái hoá học hoặc điện tử bất kỳ trong cấu trúc. Các chất tạo màu formazan là hợp chất tạo màu được tạo ra bằng cách khử muối tetrazoli bằng dehydrogenaza và reductaza. Chất tạo màu formazan có nhiều màu khác nhau từ xanh dương đậm đến đỏ sẫm, đến da cam, tùy thuộc vào muối tetrazoli ban đầu được sử dụng làm cơ chất đối với phản ứng. Danh mục các muối tetrazoli bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, TTC (tetrazoli, tetrazoli clorua hoặc 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoli clorua), INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoli clorua), MTT (3-(4, 5-dimetyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H- tetrazoli bromua), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazoli-5-carboxanilit), NBT (Xanh Nitro Tetrazoli (Nitroblue Tetrazolium)), MTS (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxiphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli), hoặc DCPIP (2,6-diclophenolindophenol). Một số muối tetrazoli dễ tan trong nước hơn so với các muối tetrazoli khác. Khi khử bằng enzym hoặc khử trong điều kiện hoá học như cho phản ứng với nicotinamit adenin dinucleotit hydrua (NADH) hoặc nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADPH) hoặc chất vận chuyển hydrua bất kỳ, muối tetrazoli có thể chuyển màu và thậm chí có thể tạo ra chất kết tủa không tan. Kết quả có thể được

phát hiện bằng các phương pháp như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bằng cách quan sát trực tiếp, sử dụng máy so màu, sử dụng thiết bị dò tử ngoại, sử dụng phổ quang kế, sử dụng thiết bị đọc phân tích hình ảnh, v.v..

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym đối với một chất phân tích chọn trước bao gồm các bước:

- (a) cung cấp thiết bị phân tích có dải bao gồm:
  - (i) một tấm đơn; và
  - (ii) cơ chất được gắn lên dưới dạng khô;
- (b) đặt mẫu lên tấm đơn mà cơ chất đã được gắn;
- (c) cho mẫu chảy qua tấm phân cắt đơn đến cơ chất;
- (d) cho mẫu phản ứng với cơ chất để tạo thành sản phẩm phản ứng; và
- (e) nhận biết và diễn giải sản phẩm phản ứng để chỉ ra sự có mặt hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu.

Theo một phương án được ưu tiên, chất phân tích là enzym như G6PD.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym để phát hiện sự có mặt của G6PD bao gồm các bước:

- (a) chế tạo thiết bị phân tích chứa dải dạng tấm đơn bao gồm:
  - (i) một tấm phân cắt đơn đã được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải;
  - (ii) hỗn hợp phân tích chứa glucoza-6-phosphat, nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP), hoặc nicotinamit adenin dinucleotit (NAD), chất vận chuyển hydrua, và hỗn hợp của chúng; và
  - (iii) muối tetrazoli,
- (b) cho mẫu lên tấm phân cắt đơn;
- (c) cho mẫu chảy qua tấm phân cắt để tiếp xúc với hỗn hợp phân tích;
- (d) cho mẫu phản ứng với hỗn hợp phân tích để tạo ra sản phẩm phản ứng; và
- (e) nhận biết và diễn giải sản phẩm phản ứng để chỉ ra sự có mặt hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu.

Sáng chế đề xuất phân tích dòng ngang, trong đó vùng đặt mẫu (mẫu) và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được nơi toàn bộ hỗn hợp phản ứng (chất phản ứng) được gắn lên cùng một mặt phẳng của một tấm đơn.

Ngoài ra, sáng chế còn được phát triển dựa trên phương pháp phân tích có định dạng khô, trong đó mẫu đã cho vào vùng đặt mẫu sẽ di chuyển đến vùng phản ứng nhờ lực mao dẫn, trong khi vùng đặt mẫu và vùng phản ứng nằm trên cùng một mặt phẳng. Chất phản ứng chứa tổ hợp của các thành phần gồm enzym và chế phẩm để gây ra phản ứng tạo màu và được gắn vào dưới dạng khô. Theo sáng chế, mẫu di chuyển đến vùng phản ứng và được kết hợp với chất phản ứng.

Khi mẫu được kết hợp với chất phản ứng, sản phẩm tạo ra sẽ kết tủa, di chuyển từ từ và ở lại trên vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được, trong khi các thành phần còn lại trong mẫu, như hemoglobin, sẽ tiếp tục di chuyển để tách ra khỏi chế phẩm mong muốn thu được nhờ lực mao dẫn chẳng hạn. Khi phản ứng với mẫu chứa chất phân tích, vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được sẽ thể hiện kết quả trong chất chỉ thị, ví dụ chất chỉ thị màu, để có thể quan sát trực tiếp được. Quá trình lưu giữ chế phẩm tạo ra và quá trình di chuyển mao dẫn tiếp tục diễn ra đối với thành phần còn lại trong mẫu sẽ loại bỏ sự cản trở bất kỳ của chất phân tích khác, như hemoglobin, và cải thiện khả năng nhận biết kết quả. Mẫu di chuyển nhờ lực mao dẫn trong chất lỏng chứa trong mẫu, như máu, hoặc dung dịch đệm, sẽ được cho vào bổ sung cùng với mẫu này.

#### Dải dạng tấm đơn

Sáng chế đề xuất thiết bị là dải dạng tấm đơn, trong đó toàn bộ vùng đặt mẫu và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được đều nằm trên tấm đơn. Phương pháp phân tích được thực hiện trong một tấm đơn sẽ tạo ra sự di chuyển đồng đều của chất phân tích và cho kết quả nhất quán nhờ loại trừ được tình trạng di chuyển không đồng đều của mẫu quá nhiều lớp. Ví dụ, khi cho mẫu máu vào dải dạng tấm đơn đã được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải, thì hemoglobin có thể được tách ra một cách dễ dàng khỏi chế phẩm thu được.

Ngoài ra, độ nhạy cũng được gia tăng trong trong thiết bị là dải dạng tấm đơn nhờ gia tăng được lượng thực tế của chất phân tích phản ứng với chất phản ứng, so với lượng chất phân tích, khi mẫu di chuyển qua cùng một bề mặt thay vì di chuyển qua

nhiều môi trường hoặc lớp khác nhau. Thêm vào đó, khi sử dụng thiết bị là dải dạng tấm đơn, giá thành sản xuất sẽ thấp hơn và quy trình sản xuất sẽ đơn giản hơn so với giá thành sản xuất và quy trình sản xuất thiết bị phân tích dạng nhiều lớp thông thường.

Ví dụ, thiết bị phân tích BinaxNOW®G6PD có dải bao gồm hai tấm khác nhau là tấm mẫu và tấm phản ứng. Các mẫu có hoạt tính G6PD bình thường tạo ra sự thay đổi màu riêng biệt. Mẫu có màu đỏ chuyển thành màu nâu/đen trên nửa trên của tấm phản ứng. Màu của sản phẩm phản ứng trong mẫu máu không loại bỏ được màu của hemoglobin; do đó màu nâu/đen không có sự khác biệt rõ rệt so với màu đỏ của máu. Không giống như hệ có hai hoặc nhiều pha và không liên tục được sử dụng trong các thiết bị khác, kể cả BinaxNOW®G6PD, sáng chế sử dụng phương pháp sắc ký đơn pha và liên tục. Dải phân tích bao gồm một tấm đơn và phương pháp sắc ký liên tục cho phép tách chế phẩm thu được cùng với chất tạo màu, như chất tạo màu formazan, một cách dễ dàng hơn ra khỏi hemoglobin trên dải này so với phương pháp sắc ký hai pha.

Thiết bị theo sáng chế bao gồm ba vùng, vùng đặt mẫu (mẫu), vùng phản ứng và vùng kết quả. Vùng phản ứng là vùng mà tổ hợp thành phần gây ra phản ứng tạo màu được gắn lên dưới dạng khô và vùng kết quả là vùng để đọc bằng mắt và vùng mẫu là vùng mà mẫu được cho vào. Do các vùng này chứa cùng một nền, nên định dạng liên tục trên một tấm sẽ cho phép tạo ra sự di chuyển đồng đều của chất phân tích và cho kết quả nhất quán nhờ loại trừ được khả năng di chuyển không đều của mẫu qua nhiều lớp. Ngoài ra, độ nhạy cũng được gia tăng nhờ gia lượng thực tế của chất phân tích phản ứng với chất phản ứng so với lượng chất phân tích di chuyển qua nhiều lớp. Thêm vào đó, định dạng theo sáng chế cũng giúp làm giảm giá thành của sản phẩm và làm cho quy trình sản xuất sản phẩm trở nên dễ dàng hơn so với giá thành và quy trình sản xuất thiết bị phân tích dạng nhiều lớp thông thường.

#### Phân tích sắc ký dòng ngang

Chất phân tích phản ứng với chất phản ứng bằng cách sử dụng các phản ứng khác nhau, như phản ứng miễn dịch giữa kháng thể-kháng nguyên, phản ứng enzym-cơ chất, phản ứng tạo thể liên hợp protein-cơ chất, hoặc phản ứng tạo phức hợp cơ chất-cơ chất.

Trong khi các phương pháp phân tích miễn dịch thường sử dụng phân tích sắc ký

dòng ngang, thì phân tích sắc ký dòng ngang lại không được sử dụng phổ biến cho phân tích enzym. Phân tích enzym dòng ngang có khả năng nhận biết một enzym nhất định về sự có mặt hoặc không có mặt và nồng độ của nó bằng cách sử dụng phản ứng với cơ chất và phát hiện phản ứng này bằng cách sử dụng chất chỉ thị như chất tạo màu chẳng hạn, chất này có thể biểu hiện một màu nhất định khi phản ứng với một hoá chất nhất định, như hydrua, được tạo bởi phản ứng giữa enzym và cơ chất.

#### Glucoza-6-phosphat Dehydrogenaza (G6PD)

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tích trên cơ sở enzym, như phân tích phát hiện trực tiếp sự có mặt của enzym trong mẫu, như G6PD trong mẫu máu, trong đó sử dụng hoạt tính của chất chuyển hoá từ phản ứng giữa enzym và cơ chất của nó, phản ứng này có thể khử chất tạo màu để biểu hiện các chất chỉ thị nhất định như chất tạo màu chẳng hạn. Phân tử chất tạo màu, như hợp chất tetrazoli, có thể được khử để tạo ra formazan không hoà tan. Formazan không hoà tan sẽ biểu hiện màu tía có thể dễ dàng nhận biết bằng cách quan sát trực tiếp mà không cần sử dụng thiết bị đặc hiệu bất kỳ.

Enzym glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD) của người thực hiện một chức năng thiết yếu trong quá trình sinh hoá ở người. Nó là một thành phần trong con đường oxy hoá pentoza, trong đó nó có chức năng làm giảm tác dụng oxy hoá các gốc tự do trong tế bào đến mức tối thiểu bằng cách tạo ra các chất khử tương đương. Ví dụ, G6PD chuyển hoá glucoza-6-phosphat thành 6-phosphoglutonat, qua đó giải phóng proton có hoạt tính khử nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) thành NADPH, dạng khử của NADP. NADPH sẽ khởi đầu một loạt các phản ứng diễn ra sau đó để cuối cùng khử các chất oxy hoá gốc tự do và làm cho nhiều chất trong số chúng trở nên mất tác dụng trong quá trình sinh hoá bình thường ở người.

G6PD có mặt trong hầu hết các tế bào của người, nhưng nó có mặt với nồng độ cao hơn trong hồng cầu, trong một trong số chức năng cơ bản của chúng, chức năng vận chuyển oxy và do đó, đặc biệt nhạy cảm với tác dụng oxy hoá. Enzym này giúp bảo vệ hồng cầu khỏi bị tổn thương do oxy hoá và phá huỷ sớm. Hiệu suất của hệ G6PD là khá cao như được phản ánh bởi thực tế là, trong hoạt động thông thường, có ít hơn 1% khả năng của nó được sử dụng để chống lại và ngăn ngừa các phản ứng oxy hoá không mong muốn. Tuy nhiên, khi các chất oxy hoá mạnh, như các thuốc thuộc

nhóm thuốc chống sốt rét quinin cần phải được đưa vào cơ thể người, cần gia tăng mạnh mức độ tạo chất khử trong một khoảng thời gian nhanh chóng.

Một số đột biến gen mã hoá G6PD là đã biết, các đột biến này làm giảm hiệu suất của enzym trong quá trình sinh hoá của các đối tượng có đột biến này ở cả hai nửa trong hệ gen của chúng, qua đó dù giữ cho lượng G6PD của họ vẫn ở mức tương đương như trong người có gen bình thường, song cũng làm cho G6PD của họ có hoạt tính đặc hiệu giảm mạnh. Ở các đối tượng này, việc sử dụng chất oxy hoá mạnh, như các thuốc thuộc nhóm thuốc chống sốt rét loại quinin, có thể gây ra các biến chứng lâm sàng nghiêm trọng, như thiếu máu tan huyết, do hoạt tính đặc hiệu thấp của G6PD của họ không cho phép tạo ra đủ chất khử để ngăn ngừa các tác dụng oxy hoá không mong muốn diễn ra nhanh chóng trên hồng cầu của họ. Do đó, ở các vùng nơi bệnh nhiễm sốt rét là phổ biến và tại các thời điểm dịch bệnh dai dẳng, cần có phương pháp phân tích hữu hiệu có thể thực hiện một cách nhanh chóng để dàng phân biệt những người có G6PD với hoạt tính đặc hiệu thấp với những người có hoạt tính G6PD bình thường và cho phép nhân viên y tế đảm bảo rằng: (1) các thuốc chống sốt rét quinin chỉ được kê cho những người có hoạt tính đặc hiệu của G6PD ở mức bình thường hoặc tốt hơn; và (2) những người có hoạt tính của G6PD thấp hơn mức bình thường được sử dụng loại thuốc chống sốt rét khác

Ngoài ra, các loại thuốc khác nhau cũng đã được biết là làm tăng tình trạng thiếu máu tan huyết và danh sách các thuốc này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc chống sốt rét (primaquin, pamaquin, v.v.), các sulfonamid (sulphanilamid, sulphaxetamid, sulphapyridin, sulphametoxazol, v.v.), các sulfon (dapson, v.v.), các nitrofurantoin (nitrofurantoin, v.v.), và các thuốc khác (axit nalidix, naphtalen, xiprofloxacin, xanh metylen, xanh toluidin, v.v.).

Để phân tích mức độ thiếu G6PD, hồng cầu chứa glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD) được phân giải lên dải phân tích khi nó di chuyển đến vùng tiếp xúc với vùng đặt mẫu đã được xử lý sơ bộ bằng thuốc thử phân giải máu. G6PD trong hồng cầu đã phân giải phản ứng với cơ chất của nó trong dải khô đã được xử lý sơ bộ, và phản ứng enzym diễn ra để khởi động quá trình tạo màu với sự có mặt của chất tạo màu tetrazoli và chất vận chuyển hydrua. G6PD được xúc tác có thể oxy hoá glucoza-6-phosphat để giải phóng NADPH và NADPH được giải phóng sẽ khử chất tạo màu tetrazoli để biến đổi màu của chất tạo màu tetrazoli thành formazan, như màu

tía hoặc xanh dương, v.v., màu này có thể được phát hiện bằng cách quan sát trực tiếp trên cùng một tấm.

Theo một phương án cụ thể, dải phân tích được chế tạo trong một lớp đơn mà vùng đặt mẫu và vùng phản ứng tạo màu nằm trên cùng một tấm. Mặt trên của dải phân tích gồm tấm hấp phụ chứa vật liệu thấm nước, nếu cần. Dải phân tích được xử lý sơ bộ bằng thuốc thử phân giải bao gồm các chất hoạt động điện ly hoặc không điện ly. Dải này giúp tạo ra quy trình đơn giản để thực hiện phân tích do không cần đến bước phân giải máu trước khi cho mẫu. Dải phân tích đã xử lý sơ bộ được tẩm các thuốc thử gồm: glucoza-6-phosphat là cơ chất đặc hiệu của G6PD, coenzym NADP hoặc NAD, chất tạo màu tetrazoli, và chất vận chuyển hydrua và chất làm ổn định dưới dạng gốc đường hoặc polyme tan trong nước.

#### Phân tích chẩn đoán nhanh (RDT) và phân tích kép

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích chẩn đoán nhanh (RDT) dưới dạng phân tích có định dạng khô trên dải dạng tấm đơn dùng cho phân tích tại nơi khám. Phương pháp sắc ký bên có định dạng khô giúp tạo ra thiết bị phân tích ổn định với quy trình thực hiện đơn giản và cho kết quả phân tích nhanh. Bệnh thiếu G6PD là một trong số các bệnh thiếu enzym phổ biến nhất ở người, bệnh này có tác động trên 400 triệu người và rất phổ biến ở các vùng bị bệnh dịch địa phương là bệnh sốt rét. Bệnh thiếu enzym này dường như cũng tạo ra sự bảo vệ nhất định đối với bệnh nhiễm sốt rét. Tuy nhiên, nó cũng có thể gây tan huyết khi sử dụng một số thuốc sốt rét nhất định, kể cả PRIMAQUINE. Do đó, việc có được phân tích chẩn đoán nhanh (RDT) thích hợp để sử dụng ngoài hiện trường nhằm mục đích sàng lọc là một nhu cầu thực sự cấp thiết.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích, trong đó kết quả của phân tích RDT đối với G6PD sử dụng các mẫu lâm sàng có thể tương quan với kết quả phân tích định lượng. Phân tích này có thể phát hiện tình trạng thiếu G6PD ở mức khoảng  $\leq 4$  IU/gHb (bình thường  $12 \pm 2,09$  U/gHb ở  $37^{\circ}\text{C}$ ). Ngưỡng này có thể được thay đổi tùy thuộc vào mức dung nạp của hồng cầu đối với PRIMAQUINE ở bệnh nhân bị thiếu G6PD. Các nghiên cứu về tính ổn định gia tăng đã cho thấy rằng các dải phân tích theo sáng chế ổn định trong thời gian ba tháng ở nhiệt độ  $45^{\circ}\text{C}$  và trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$ . Phân tích RDT này đối với G6PD có thể

được kết hợp với phân tích RDT đối với bệnh sốt rét có khả năng phát hiện ít hơn 30 ký sinh trùng trong mỗi  $\mu\text{l}$  máu. Kit phân tích kép này có thể đồng thời chẩn đoán bệnh nhiễm sốt rét và thiếu G6PD mà chỉ sử dụng một lượng máu nhỏ (thường nhỏ hơn  $10\mu\text{l}$ ). Phân tích này được thực hiện nhanh ( $<10$  phút) với lượng mẫu nhỏ ( $<10\mu\text{l}$  máu), sử dụng đơn giản, có giá thành thấp, dễ mang, và không cần bảo quản đặc biệt, một điều kiện thiết yếu để sử dụng ngoài hiện trường.

#### Sắc ký dòng ngang

Nhiều phân tích tại nơi khám bệnh được áp dụng phổ biến nhất sử dụng phân tích dòng ngang trên cơ sở phương pháp sắc ký miễn dịch trên màng, phương pháp này tận dụng tác dụng mao dẫn của màng vi xốp. Trong phân tích sắc ký dòng ngang, chất phân tích trong dung dịch mẫu trong pha động được tách ra khỏi các thành phần còn lại nhờ gắn kết ái lực với các phân tử bất giữ trên các pha tĩnh rắn. Màng, làm bằng nitroxenluloza hoặc nylon, tạo ra nền cho pha tĩnh rắn trong phương pháp sắc ký ái lực và pha lỏng trong sắc ký phân bố sẽ điều khiển các hạt phức hợp miễn dịch cần được tách ra khỏi các chất tan còn lại trong chất lỏng nhờ tác dụng mao dẫn.

Màng vi xốp, làm bằng nylon hoặc nitroxenluloza, đã được sử dụng cho phân tích kháng nguyên/kháng thể khoảng từ năm 1979 khi lần đầu tiên chứng minh được rằng protein có thể được vận chuyển qua màng. Nitroxenluloza đã được sử dụng rộng rãi làm bề mặt cho protein bất động trong các kỹ thuật nghiên cứu như thẩm tách Tây và chẩn đoán miễn dịch dòng ngang. Tính vi xốp và nitroxenluloza tạo ra nhiều lợi ích cho phân tích sắc ký miễn dịch nhanh bao gồm khả năng gắn kết cao, gắn kết không cộng hoá trị của các protein, và môi trường làm bất động ổn định trong thời gian dài.

Nói chung, trong phương pháp sắc ký bên, kể cả các phân tích được dẫn bởi enzym như phân tích về tình trạng thiếu G6PD, cơ chất khô đã được gắn trước vào gần và vừa đủ qua chỗ nối vùng nhận mẫu trên dải sắc ký, cụ thể là dải dạng tấm đơn theo sáng chế. Tuy nhiên, nó có thể được bố trí ở vị trí khác trong đường chảy của mẫu để phù hợp với các yêu cầu cụ thể của mẫu hoặc một hoặc nhiều thành phần trong cơ chất, với điều kiện nó nằm trong đường chảy trước đáng kể so với điểm cuối hoặc “tấm hấp phụ”, nơi dòng mẫu dừng lại và chất lỏng dư bất kỳ có mặt sẽ chảy hết vào tấm hấp phụ hoặc bộ phận chứa khác có thể được cung cấp.

Điều quan trọng là cơ chất khô phải được gắn thành hàng, tốt hơn là bên trong

một vùng giới hạn, để tạo thuận lợi cho sự tiếp xúc với dòng chảy xuôi của mẫu. Vị trí trong đường chảy của cơ chất khô cũng cần được xem xét để tốt hơn nếu quá trình hoàn nguyên cơ chất ở dạng hoà tan hoặc phân tán bên trong mẫu lỏng sẽ kết thúc tại thời điểm mẫu di chuyển đến vị trí mà dòng mẫu dừng lại.

Để thuận tiện cho việc vận chuyển, bảo quản và sử dụng, tốt hơn nếu mỗi dải sắc ký theo sáng chế có thể được chứa bên thiết bị thích hợp có kết cấu sao cho dải này được chứa ở phía bên. Nhiều thiết bị như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực này và thiết bị bất kỳ trong số này cần có cấu trúc sao cho tính năng của phân tích trên dải sắc ký chứa trong đó được thực hiện bởi dòng ngang có thể được sử dụng một cách thích hợp.

Theo một phương án cụ thể, dải dạng tấm đơn theo sáng chế có các đặc tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính sau:

1. Dải dạng tấm đơn này chứa nền xốp được chọn từ màng nitroxenluloza, sợi thủy tinh, xenluloza hoặc polyeste, v.v.,
2. Dải này là dải dạng tấm đơn, trong đó vùng đặt mẫu và vùng gắn hỗn hợp thuốc thử khô trong dải này nằm trong cùng một tấm, bất kể hai vùng này có chồng lên nhau hay không.
3. Dải theo sáng chế có một đường đơn của dòng chất lỏng đến hỗn hợp phản ứng được tạo ra sau khi nhận chất lỏng mẫu.
4. Dải dạng tấm đơn theo sáng chế tùy ý có thể được phủ trước bằng thuốc thử phân giải chứa chất hoạt động bề mặt điện ly (anion, cation và ion lưỡng tính) hoặc không điện ly và magie clorua để cho phép phân giải chất lỏng sinh học bằng cách tiếp xúc trực tiếp với vùng đặt mẫu mà không phân giải trước bằng dung dịch đệm.
5. Dải dạng tấm đơn theo sáng chế chứa gốc đường được chọn từ monosacarit, disacarit, polysacarit hoặc polyme tan trong nước làm chất làm ổn định để làm tăng độ bền nhiệt.
6. Dải dạng tấm đơn theo sáng chế được chế tạo riêng và lắp ráp với nhau trong thiết bị phân tích có định dạng kép để phân biệt tình trạng thiếu G6PD ở mức trung bình (ví dụ: phát hiện được ở mức 10-60% hoạt tính bình thường) và nghiêm trọng (ví dụ: phát hiện được ở mức nhỏ hơn 10% hoạt tính bình thường) bằng cách quan sát

trực tiếp. % hoạt tính phát hiện được không chỉ giới hạn ở mức 10-60% hoặc nhỏ hơn 10%.

7. Các thành phần trong vùng phản ứng bao gồm cơ chất của enzym, thuốc thử hiện màu và chất làm ổn định. Hệ tấm đơn có thể được sử dụng cho phân tích định lượng hoặc bán định lượng khi mức đổi màu trên dải này có thể đọc được bằng các thiết bị như quang phổ kế quang học, máy quét, máy đọc, hoặc mật độ kế.
8. Hệ tấm đơn theo sáng chế cũng có thể sử dụng được cho hệ điện hoá. Điện tử chuyển từ NADPH hoặc NADH được tạo bởi G6PD đến điện cực nhờ oxidoreductaza hoặc chất trung gian vận chuyển điện tử có thể được định lượng bằng cách sử dụng điện cực với định dạng khô.
9. Hệ tấm đơn theo sáng chế có thể được sử dụng cho phân tích miễn dịch để làm bất động các phân tử bất giữ trên pha rắn.

Tách hemoglobin từ chất phân tích bằng phương pháp sắc ký vi sai

Các thông số chính điều khiển cường độ tín hiệu trong phân tích sắc ký bên là tốc dòng mao dẫn và khả năng gắn kết với protein của màng. Tốc độ dòng mao dẫn và khả năng gắn kết được xác định bởi kích cỡ lỗ xốp, độ xốp, và độ dày của màng. Khả năng gắn kết với protein của màng phụ thuộc vào kích cỡ lỗ xốp của nó và các đặc tính bề mặt.

Sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký, trong đó hemoglobin được tách ra khỏi chất phân tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký vi sai trên pha rắn. Màu của hemoglobin thường cản trở khả năng đọc bằng mắt phản ứng màu của chất phân tích trong hồng cầu. Sáng chế đề xuất phương pháp sắc ký bên, trong đó sự di chuyển khác nhau của các mẫu là do sự khác biệt về kích cỡ, độ nhớt, khả năng kết tủa của chất phân tích với chất phản ứng, sự khác biệt về điện tích qua nền xốp đã được tẩm các thuốc thử sẽ tương tác với chất phân tích. Các tế bào máu được cho lên vùng mẫu đã được xử lý sơ bộ bằng chất phân giải để phân giải máu đỏ vào vùng phản ứng và dung dịch đệm cũng được cho lên, nếu cần. Các tế bào máu đã phân giải di chuyển đến vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được và được kết hợp với chất phản ứng, chế phẩm thu được sẽ ở lại trên vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được, trong khi hemoglobin tiếp tục di chuyển để được tách ra khỏi chế phẩm mong muốn thu được nhờ lực mao dẫn chẳng hạn. Việc tách hemoglobin sẽ khiến cho việc phát hiện kết quả bằng chất chỉ thị,

như chất chỉ thị màu chẳng hạn, trở nên rõ rệt hơn nữa và dễ nhận biết hơn nữa.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Thiết bị phân tích G6PD đặc hiệu có thể sử dụng được một cách dễ dàng và thành công bởi bất kỳ ai tại hiện trường như nhà riêng, phòng khám của bác sỹ hoặc tại địa điểm bất kỳ nơi không có người được đào tạo về kỹ năng phân tích và không có trang bị phân tích được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.3 kèm theo.

Ví dụ 1. Chuẩn bị và thực hiện các phân tích mẫu đối với dải phân tích về tình trạng thiếu 6PD

Tấm được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải và tấm này được làm khô ở nhiệt độ trong phòng. Kết cấu của dải dạng một tấm và hai tấm được thể hiện trên FIG.1. Gắn tấm đã được xử lý sơ bộ lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo và đặt giấy thấm nước chồng lên tấm này ở phần đầu trên tấm đỡ làm bằng chất dẻo làm tấm hấp phụ. Điều chế hỗn hợp phân tích chứa glucoza-6-phosphat, NADP, tetrazoli, và hydrua hoặc chất chuyển điện tử và tấm hỗn hợp này lên tấm xốp. Để khô tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích ở nhiệt độ trong phòng qua đêm.

- Chuẩn bị một tấm: Gắn tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.
- Chuẩn bị hai tấm: Gắn tấm dùng để cho mẫu vào đáy hỗn hợp phân tích - đặt tấm đã được tấm chồng 1-2mm lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.

Cho mẫu bình thường hoặc mẫu bị thiếu G6PD lên dải. Kết quả thu được cho thấy rằng các mẫu bình thường tất nhiên tạo ra màu tía đậm hơn và rõ rệt hơn trong hệ là hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với màu được tạo ra trong hệ là dải dạng hai tấm, như được thể hiện trên FIG.2. Mẫu thiếu G6PD không tạo ra màu bất kỳ ở cả một tấm và hai tấm do không có G6PD khả dụng để tạo ra NADPH. Kết quả này cũng cho thấy thêm rằng sự di chuyển của chất lỏng là đồng đều hơn và nhanh hơn ở một tấm so với hai tấm và quá trình thanh thải máu kết thúc nhanh hơn ở hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với quá trình thanh thải máu ở hệ dạng hai tấm.

Ví dụ 2. Chuẩn bị và thực hiện các phân tích mẫu đối với dải phân tích lactat dehydrogenaza

Tấm được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải chứa magie clorua và tấm

này được làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Gắn tấm đã được xử lý sơ bộ lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo và đặt giấy thấm nước chồng lên tấm này ở phần đầu trên tấm đỡ làm bằng chất dẻo làm tấm hấp phụ. Điều chế hỗn hợp phân tích chứa lactat, NAD, tetrazoli, và dung dịch đệm Tris-HCl có độ pH=8,0, chất vận chuyển hydrua và tấm hỗn hợp này lên tấm xốp. Để khô tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích ở nhiệt độ trong phòng qua đêm.

- Chuẩn bị một tấm: Gắn tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.
- Chuẩn bị hai tấm: Gắn các tấm dùng để cho mẫu vào đáy hỗn hợp phân tích - đặt tấm đã được tấm chồng 1-2mm lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.

Cho hai microlit mẫu máu lên dải. Kết quả thu được cho thấy rằng enzym LDH trong máu tất nhiên tạo ra màu tía đậm hơn và rõ rệt hơn trong hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với màu tía trong hai tấm, như được thể hiện trên FIG.4. Kết quả này cũng cho thấy thêm rằng sự di chuyển của chất lỏng là đồng đều hơn và nhanh hơn ở hệ là dải dạng một tấm so với hai tấm và quá trình thanh thải máu kết thúc nhanh hơn ở hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với quá trình thanh thải máu ở hệ dạng hai tấm. Cường độ của màu tía được đo bằng thiết bị đọc aQzen Reader như được thể hiện trong Bảng 1. Cường độ của hệ dạng một tấm là lớn hơn so với cường độ của hệ dạng hai tấm như được thể hiện trên FIG.5.

Bảng 1

|                 | # phân tích | Loại dải |         |
|-----------------|-------------|----------|---------|
|                 |             | Một tấm  | Hai tấm |
| Cường độ bất kỳ | Thứ nhất    | 49,51    | 35,79   |
|                 | Thứ hai     | 47,38    | 36,49   |
|                 | Thứ ba      | 45,37    | 34,99   |
| Trung bình      |             | 47,42    | 35,76   |

Ví dụ 3. Chuẩn bị và thực hiện các phân tích mẫu đối với dải phân tích rượu

Tấm được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm chứa chất tẩy rửa và tấm này được làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Gắn tấm đã được xử lý sơ bộ lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo và đặt giấy thấm nước chồng lên tấm này ở phần đầu trên tấm đỡ làm

bằng chất dẻo làm tấm hấp phụ. Điều chế hỗn hợp phân tích chứa rượu, NAD, tetrazoli, và dung dịch đệm Tris-HCl có độ pH=8,0, chất vận chuyển hydrua và tấm hỗn hợp này lên tấm xốp. Để khô tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích ở nhiệt độ trong phòng qua đêm.

- Chuẩn bị một tấm: Gắn tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.
- Chuẩn bị hai tấm: Gắn các tấm dùng để cho mẫu vào đáy hỗn hợp phân tích - đặt tấm đã được tấm chồng 1-2mm lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.

Cho 2 microlit mẫu máu chứa rượu lên dải. Kết quả thu được cho thấy rằng sự có mặt rượu trong máu tất nhiên tạo ra màu tía đậm hơn và rõ rệt hơn trong hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với màu tía trong hai tấm, như được thể hiện trên FIG.6. Cường độ của màu tía được đo bằng thiết bị đọc aQzen Reader như được thể hiện trong Bảng 2. Cường độ ở hệ dạng một tấm là cao hơn so với cường độ của hệ dạng hai tấm như được thể hiện trên FIG.7.

Bảng 2

|                 |          | Một tấm | Hai tấm |
|-----------------|----------|---------|---------|
| Cường độ bất kỳ | Thứ nhất | 89,00   | 48,45   |
|                 | Thứ hai  | 89,88   | 49,90   |
|                 | Thứ ba   | 90,42   | 51,00   |
| Trung bình      |          | 89,77   | 49,79   |
| Độ lệch chuẩn   |          | 0,51    | 0,90    |

Ví dụ 4. Chuẩn bị và thực hiện các phân tích mẫu đối với dải phân tích lactat dehydrogenaza - phụ thuộc vào hoạt tính của lactat dehydrogenaza

Tấm được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm chứa chất tẩy rửa và tấm này được làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Gắn tấm đã được xử lý sơ bộ lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo và đặt giấy thấm nước chồng lên tấm này ở phần đầu trên tấm đỡ làm bằng chất dẻo làm tấm hấp phụ. Điều chế hỗn hợp phân tích chứa lactat, NAD, tetrazoli, và dung dịch đệm Tris-HCl có độ pH=8,0, chất vận chuyển hydrua và tấm hỗn hợp này lên tấm xốp. Để khô tấm đã được tấm hỗn hợp phân tích ở nhiệt độ trong phòng qua đêm.

- Chuẩn bị một tấm: Gắn tấm đã được tẩm hỗn hợp phân tích lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.
- Chuẩn bị hai tấm: Gắn các tấm dùng để cho mẫu vào đáy hỗn hợp phân tích - đặt tấm đã được tẩm chồng 1-2mm lên tấm đỡ làm bằng chất dẻo.

Cho hai microlít mẫu chứa lactat dehydrogenaza (từ 0,5 đơn vị đến 6 đơn vị) lên dải. Kết quả thu được cho thấy rằng hoạt tính của enzym LDH tạo ra màu tía đậm hơn và rõ rệt hơn trong hệ là dải dạng một tấm theo sáng chế so với màu tía trong hai tấm, như được thể hiện trên FIG.8.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dải dùng cho phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym đối với chất phân tích chọn trước, dải này bao gồm:

tấm đơn; và

cơ chất được gắn lên dưới dạng khô;

trong đó:

tấm đơn chứa vùng đặt mẫu và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được, và vùng đặt mẫu và vùng chất phản ứng-sản phẩm thu được này được tạo ra trên cùng một mặt phẳng của tấm đơn;

tấm đơn được xử lý sơ bộ bằng dung dịch đệm dung giải để dung giải tế bào hồng cầu trong mẫu máu được đặt vào vùng đặt mẫu;

sản phẩm thu được của phản ứng giữa cơ chất với chất phân tích chọn trước là chất kết tủa;

chất phân tích chọn trước là enzym, và

hemoglobin di chuyển nhanh hơn sản phẩm thu được đã nêu.

2. Dải theo điểm 1, trong đó chất phân tích được chọn từ nhóm gồm glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD) và lactat dehydrogenaza.

3. Dải theo điểm 2, trong đó chất phân tích là G6PD.

4. Dải theo điểm 1, trong đó cơ chất là hỗn hợp chất phân tích chứa glucoza-6-phosphat, hydrua hoặc chất chuyển điện tử và ít nhất một chất trong số nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) hoặc nicotinamit adenin dinucleotit (NAD).

5. Dải theo điểm 1, trong đó cơ chất chứa chất chỉ thị.

6. Dải theo điểm 5, trong đó chất chỉ thị là hợp chất tạo màu.

7. Dải theo điểm 6, trong đó hợp chất tạo màu là muối tetrazoli.

8. Dải theo điểm 7, trong đó muối tetrazoli được chọn từ nhóm bao gồm TTC (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoli clorua), INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoli clorua), MTT (3-(4,5-dimetyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoli bromua), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazoli-5-carboxanilit), NBT (xanh nitro tetrazoli), MTS (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxyphephenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli) và DCPIP (2,6-diclophenolindophenol).

9. Phương pháp phân tích sắc ký dòng ngang được dẫn bởi enzym dùng cho chất phân tích chọn trước, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cung cấp thiết bị phân tích có dải theo điểm 1;
- (b) đặt mẫu lên tấm đơn mà cơ chất đã được gắn, trong đó mẫu là mẫu máu;
- (c) cho mẫu chảy qua tấm đơn đến cơ chất;
- (d) cho mẫu phản ứng với cơ chất để tạo thành chất kết tủa; và
- (e) nhận biết và diễn giải sản phẩm phản ứng để chỉ ra sự có mặt hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu.

10. Phương pháp phân tích theo điểm 9, trong đó chất phân tích được chọn từ nhóm gồm glucoza-6-phosphat dehydrogenaza (G6PD) và lactat dehydrogenaza.

11. Phương pháp phân tích theo điểm 9, trong đó cơ chất là hỗn hợp phân tích chứa glucoza-6-phosphat, hydrua hoặc chất chuyển điện tử và ít nhất một trong số nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) hoặc nicotinamit adenin dinucleotit (NAD).

12. Phương pháp phân tích theo điểm 9, trong đó cơ chất chứa chất chỉ thị.

13. Phương pháp phân tích theo điểm 12, trong đó chất chỉ thị là hợp chất tạo màu.

14. Phương pháp phân tích theo điểm 13, trong đó hợp chất tạo màu là muối tetrazoli.

15. Phương pháp phân tích theo điểm 14, trong đó muối tetrazoli được chọn từ nhóm gồm TTC (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoli clorua), INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoli clorua), MTT (3-(4,5-dimetyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoli bromua), XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazoli-5-carboxanilit), NBT (xanh nitro tetrazoli), MTS (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxiphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli) và DCPIP (2,6-diclophenolindophenol).

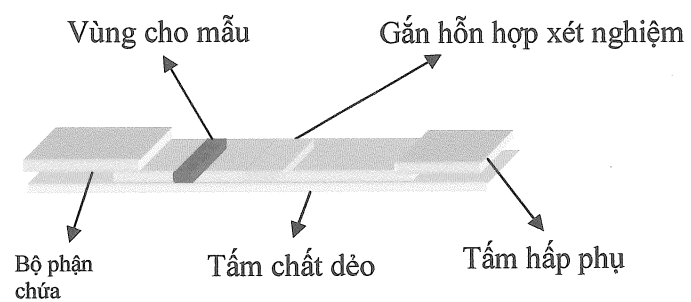
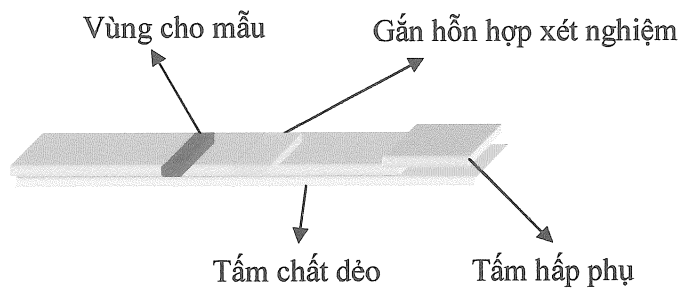
16. Phương pháp phân tích theo điểm 9, trong đó:

chất phân tích chọn trước là G6PD,

cơ chất là hỗn hợp phân tích chứa glucoza-6-phosphat, hydrua hoặc chất chuyển điện tử và ít nhất một chất trong số nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) hoặc nicotinamit adenin dinucleotit (NAD) và chứa muối tetrazoli.

FIG.1

## A. Hệ dạng một tấm



## B. Hệ dạng hai tấm

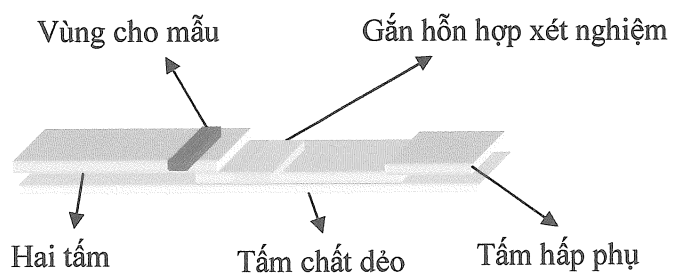
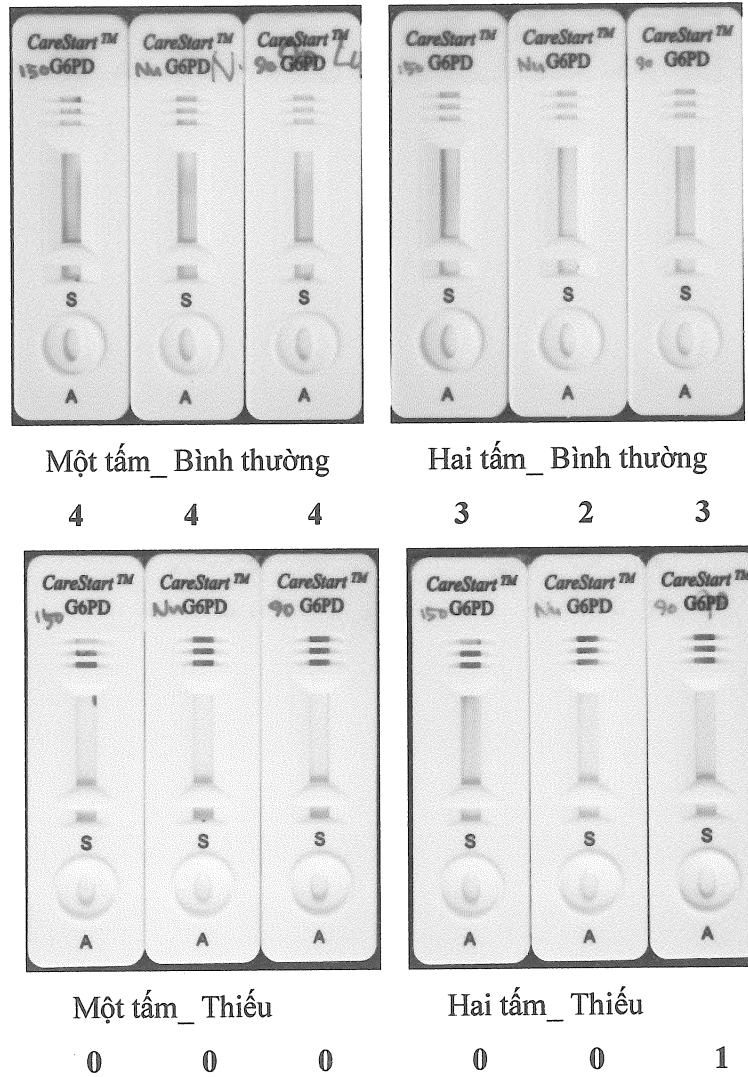


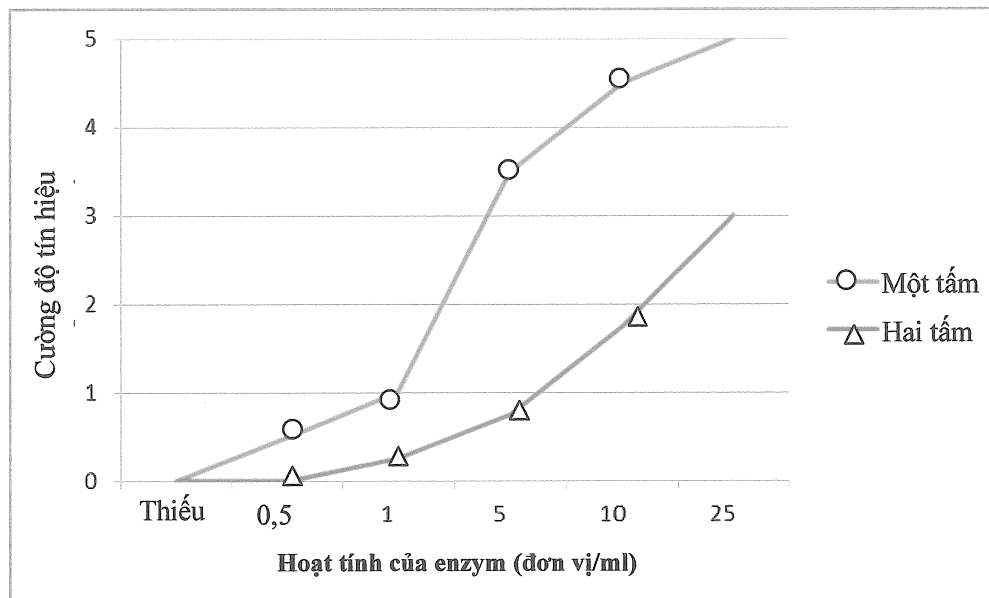
FIG.2



Cường độ màu:

0. Không màu
1. Hầu như không nhìn được
2. Màu tía nhạt
3. Màu tía trung bình
4. Màu tía đậm
5. Màu tía rất đậm

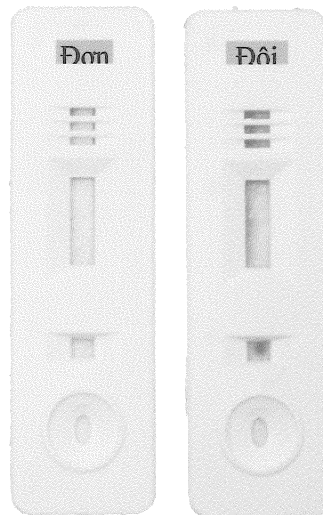
FIG.3



Cường độ màu:

0. Không màu
1. Hầu như không nhìn được
2. Màu tía nhạt
3. Màu tía trung bình
4. Màu tía đậm
5. Màu tía rất đậm

FIG.4



- Hệ dạng một tấm: Màu tía rất đậm
- Hệ dạng hai tấm: Tốc độ di chuyển của máu là chậm hơn so với hệ dạng một tấm và hiện màu tía nhạt.

FIG.5

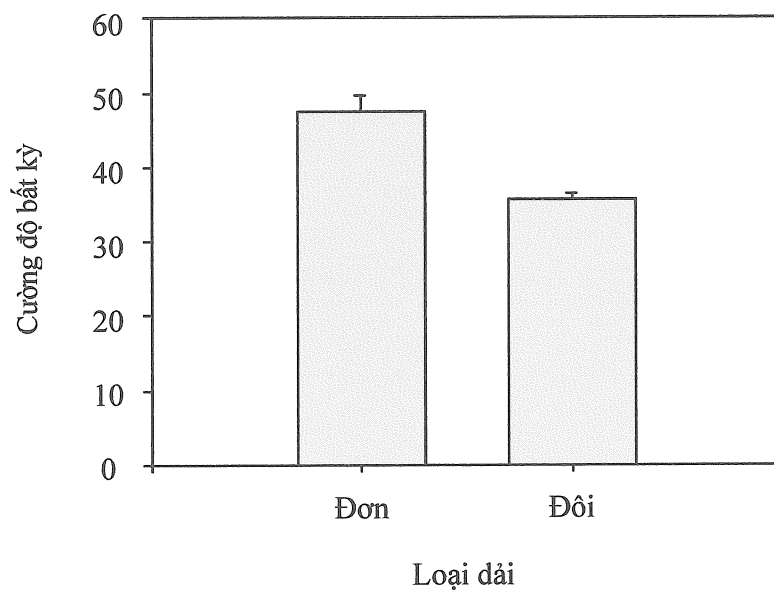


FIG.6

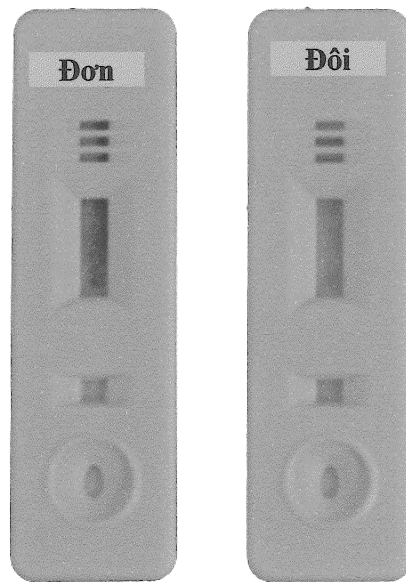


FIG.7

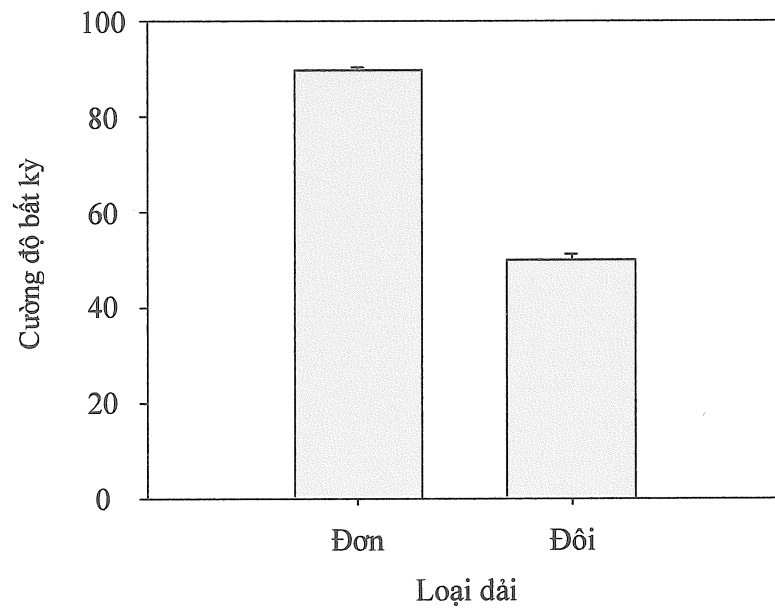
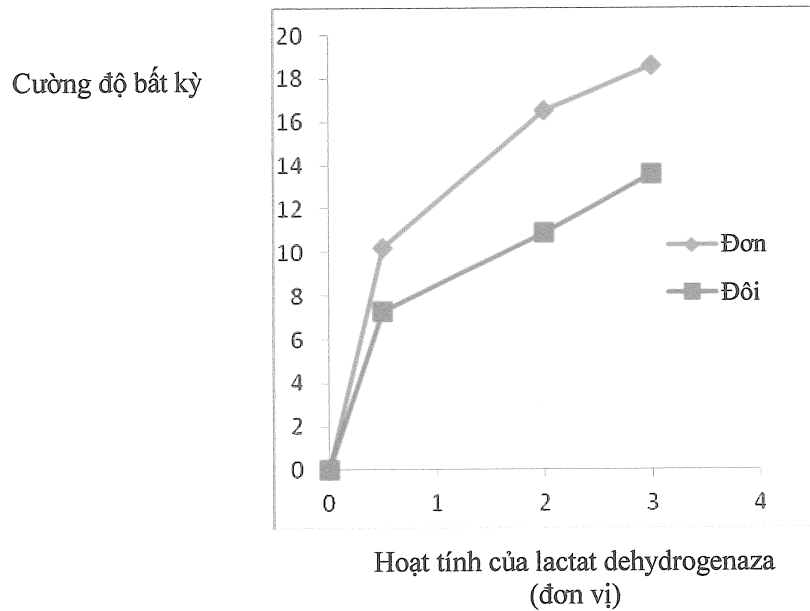


FIG.8



**Cường độ màu:**

- 0. Không màu
- 1. Hầu như không nhìn được
- 2. Màu tía nhạt
- 3. Màu tía trung bình
- 4. Màu tía đậm
- 5. Màu tía rất đậm