



(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)



1-0031040

(51)⁷ G01N 33/53; G01N 33/58; C08B 37/00; (13) B
C12N 15/115

(21) 1-2018-01729

(22) 15/06/2016

(86) PCT/KR2016/006355 15/06/2016

(87) WO 2017/057823 06/04/2017

(30) 10-2015-0139174 02/10/2015 KR

(45) 25/02/2022 407

(43) 27/08/2018 365A

(73) LEMONEX INC. (KR)

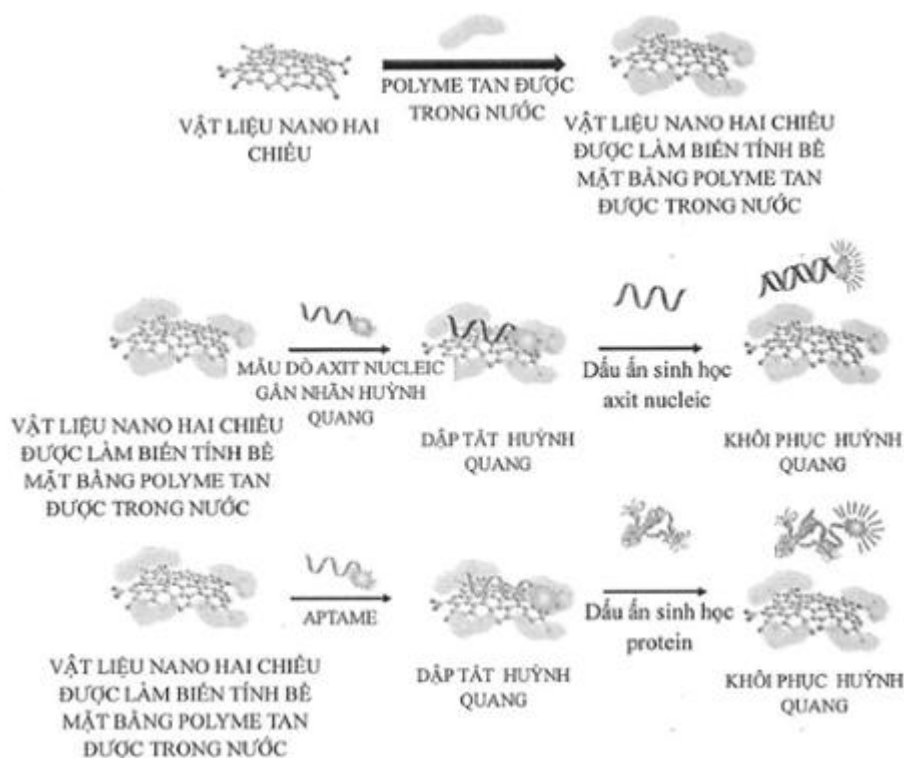
Seoul National University, 1, Gwanak-ro, Gwanak-gu Seoul 08826, Republic of Korea

(72) WON, Cheolhee (KR); MIN, Dal-Hee (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA CHẤT DẬP TẮT VÀ MẪU DÒ LIÊN HỢP VẬT LIỆU HUỖNH QUANG, PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước. Chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước dập tắt một cách hiệu quả huỳnh quang của mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang. Ngoài ra, chế phẩm chứa chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang này có thể phát hiện vật liệu đích có mặt ở nồng độ thấp, và do đó có thể thuận lợi dùng làm chế phẩm hoặc kit để cung cấp thông tin cần thiết cho việc phát hiện vật liệu sinh học hoặc việc chẩn đoán bệnh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phương pháp phát hiện axit nucleic (ADN hoặc ARN) hoặc protein đặc hiệu là các kỹ thuật quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học. Do axit nucleic hoặc protein đặc hiệu có thể được phát hiện, các nhà nghiên cứu có thể xác định dấu ấn di truyền hoặc dấu ấn sinh học nào là dấu ấn chỉ báo tình trạng sức khỏe của người. Theo phương pháp phát hiện axit nucleic hoặc protein này, sự biến đổi của

gen gây bệnh có mặt trong mẫu hoặc sự biểu hiện của gen đặc hiệu có mặt trong mẫu có thể được tìm thấy.

Tuy nhiên, polyme hữu cơ hoặc vô cơ, như graphen oxit, có cấu trúc phẳng được lấp bởi lưới hai chiều và các biến thể của chúng có thể chuyển các điện tử. Sự chuyển điện tử như vậy là do các tính chất vật lý như cấu trúc tinh thể và lưới của polyme. Cụ thể, tín hiệu huỳnh quang của thuốc nhuộm huỳnh quang hữu cơ có thể được dập tắt bởi sự chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescence resonance energy transfer - FRET).

Vì thế, sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang của polyme axit nucleic được liên hợp thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được quan sát nhờ sử dụng các tính chất vật lý của vật liệu như graphen oxit, và do đó vật liệu sinh học như axit nucleic hoặc protein có thể được phát hiện (công bố patent Hàn Quốc số 10-1496671). Ngoài ra, phương pháp phát hiện hoạt tính của enzym dựa trên phân tích huỳnh quang nhờ sử dụng vật liệu này đã được phát triển (công bố patent Hàn Quốc số 10-1554173). Gần đây, các kỹ thuật sử dụng vật liệu như vậy đã được sử dụng để quan sát gen hoặc protein của mầm bệnh hiện diện trong mẫu, và do đó đã trở nên quan trọng trong nghiên cứu ban đầu về bệnh và sự đau ốm.

Tuy nhiên, mặc dù phương pháp phát hiện nhờ sử dụng graphen oxit là đơn giản, phương pháp này có thể bị ảnh hưởng nhiều bởi lượng vật liệu đích chứa trong mẫu, và vì sự phân bố kích thước của các polyme axit nucleic được sử dụng trong quá

trình phát hiện là không đồng nhất, khoảng sai số sẽ lớn. Ngoài ra, trong môi trường *in vitro* để chẩn đoán *in vitro*, các polyme không bền, và do đó giảm khả năng tái lập.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước và chế phẩm chứa chất dập tắt này và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang. Ngoài ra, một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp cung cấp thông tin cần thiết để chẩn đoán bệnh nhờ sử dụng chế phẩm này.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích này, sáng chế đề xuất chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất dập tắt này và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp cung cấp thông tin cần thiết để chẩn đoán bệnh, phương pháp này bao gồm các bước: chuẩn bị hỗn hợp bằng cách trộn chế phẩm với mẫu phân lập được; đo mức huỳnh quang của hỗn hợp; và so sánh mức thu được với mức huỳnh quang của mẫu đối chứng bình thường.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất kit bao gồm chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước theo sáng chế dập tắt một cách hiệu quả huỳnh quang phát ra từ mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang. Ngoài ra, vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước gắn kết ổn định với mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang. Hơn nữa, khi có mặt vật liệu đích, do mẫu dò gắn kết với vật liệu đích, mẫu dò có thể dễ dàng được giải phóng khỏi vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước, và do đó vật liệu đích có thể được phát hiện một cách hiệu quả. Vì thế, chế phẩm chứa chất dập tắt này và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang có thể còn phát hiện vật liệu đích có mặt ở nồng độ thấp. Vì lý do này, chế phẩm có thể được sử dụng hiệu quả làm chế phẩm hoặc kit để cung cấp thông tin

cần thiết cho việc phát hiện vật liệu sinh học hoặc việc chẩn đoán bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ minh họa phương pháp chuẩn bị vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước và phương pháp phát hiện vật liệu sinh học nhờ sử dụng vật liệu được chuẩn bị theo cách đó.

Fig.2 là ảnh kính hiển vi lực nguyên tử (atomic force microscope - AFM) của keo nano của graphene oxit (GON) được chuẩn bị trong mẫu.

Fig.3 là các ảnh kính hiển vi điện tử truyền quét (scanning-transmission electron microscope -STEM); a) và ảnh AFM (b) của vật liệu nano hai chiều, mangan dioxit, được chuẩn bị trong mẫu.

Fig.4 là ảnh AFM của graphene oxit nano (NGO) được chuẩn bị trong mẫu.

Fig.5 là ảnh AFM (a) và đồ thị thể hiện phổ Raman (b) của GON mà được làm biến tính bề mặt bằng dextran (DReGON).

Fig.6 là ảnh AFM của NGO mà được làm biến tính bề mặt bằng polyetylen glycol (PEG-NGO; a), hoặc GON được làm biến tính bề mặt bằng PEG và polyetylenimin (PEI) (PEG-PEI-GON; b).

Fig.7 là đồ thị thể hiện tín hiệu huỳnh quang phát ra từ hỗn hợp của DReGON và PNA-US5-2 (a) hoặc PNA-DENV (b) làm mẫu dò, để xác nhận liệu chế phẩm phát hiện có được tạo ra hay không.

Fig.8 là đồ thị thể hiện tín hiệu huỳnh quang phát ra từ hỗn hợp của PEG-NGO và PNA-Sa (a) hoặc PNA-Pa (b) làm mẫu dò, để xác nhận liệu chế phẩm phát hiện có được tạo ra hay không.

Fig.9 là đồ thị thể hiện tín hiệu huỳnh quang phát ra từ hỗn hợp của PEG-PEI-GON và PNA-TS làm mẫu dò, để xác nhận liệu chế phẩm phát hiện có được tạo ra hay không.

Fig.10 là các biểu đồ so sánh tính ổn định huỳnh quang của GON (a) với tính ổn định huỳnh quang của DReGON (b).

Fig.11 là đồ thị xác nhận khả năng phát hiện vật liệu đích của DReGON và GON.

Fig.12 là đồ thị xác nhận khả năng phát hiện của PEG-NGO khi miR-21 (a) hoặc miR-223 (b) được bổ sung làm vật liệu đích ở các nồng độ khác nhau.

Fig.13 là đồ thị xác nhận khả năng phát hiện của PEG-PEI-GON khi miR-TS được bổ sung làm vật liệu đích ở các nồng độ khác nhau.

Fig.14 là các ảnh xác nhận rằng không phát hiện được tín hiệu huỳnh quang khi mẫu dò không được bổ sung vào các dòng tế bào ung thư khác nhau.

Fig.15 là các ảnh xác nhận khả năng phát hiện tế bào ung thư của DReGON trộn với PNA484 hoặc PNA31 làm mẫu dò ở các dòng tế bào ung thư khác nhau.

Fig.16 là các đồ thị xác nhận khả năng phát hiện tế bào máu của DReGON trộn với PNA21, PNA223, Let-7a hoặc hỗn hợp của chúng (trộn lẫn) làm mẫu dò.

Fig.17 là đồ thị các mức huỳnh quang được thể hiện sau khi các nồng độ khác nhau của trình tự axit nucleic gắn nhãn huỳnh quang gắn kết đặc hiệu *Pseudomonas aeruginosa* (a) hoặc *Staphylococcus aureus* (b) được trộn với PEG-NGO, và trộn với *Pseudomonas aeruginosa* hoặc *Staphylococcus aureus*.

Fig.18 là đồ thị các mức huỳnh quang được thể hiện sau khi trình tự axit nucleic gắn kết đặc hiệu với virus cytomegalo (a) hoặc virus sốt xuất huyết Dengue (b) của người được trộn với DReGON, và trộn với virus cytomegalo hoặc virus sốt xuất huyết Dengue của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chất dập tắt chứa vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước.

Thuật ngữ “polyme tan được trong nước” được sử dụng ở đây chỉ nhựa hoặc polyme mà có thể được hòa tan trong nước hoặc được phân tán dưới dạng hạt nhỏ trong nước. Polyme tan được trong nước có thể là polyme tự nhiên, polyme bán tổng hợp hoặc polyme tổng hợp. Polyme tan được trong nước mà có thể được sử dụng trong sáng chế có thể có trọng lượng phân tử là 1 đến 20 kDa, 5 đến 15 kDa hoặc 8 đến 12 kDa. Theo một phương án, trọng lượng phân tử của polyme tan được trong nước có thể là 10 kDa.

Polyme tan được trong nước có thể được chọn từ nhóm gồm có chitosan và chất dẫn xuất của nó, muối chitosan, dextran và chất dẫn xuất của nó, axit hyaluronic và chất dẫn xuất của nó, hyaluronat, pectin và chất dẫn xuất của nó, muối pectin, alginat và chất dẫn xuất của nó, axit alginic, aga, galactomanan và chất dẫn xuất của nó, muối galactomanan, xantan và chất dẫn xuất của nó, muối xantan, β -cyclodextrin và chất dẫn xuất của nó, β -cyclodextrinat, polyetylen glycol (PEG), polyetylenimin (PEI) và tổ hợp của chúng. Theo một phương án, polyme tan được trong nước có thể được chọn từ nhóm gồm có dextran, polyetylen glycol, polyetylenimin và tổ hợp của chúng.

Thuật ngữ “vật liệu nano” được sử dụng ở đây chỉ vật liệu cỡ nano. Do kích thước nhỏ, vật liệu nano có thể dễ dàng đi qua màng tế bào. Vật liệu nano có thể ở dạng phiến hoặc dạng hạt. Phiến có thể có một lớp hoặc nhiều lớp. Ngoài ra, hình dạng phiến có thể bao gồm bề mặt phẳng hoặc cong, và có thể tồn tại ở nhiều dạng khác nhau. Theo một phương án, vật liệu nano có thể là vật liệu nano loại phiến một lớp hai chiều. Ngoài ra, dạng hạt có thể bao gồm nhiều dạng khác nhau như hình cầu, ôvan, que và đa giác.

Cỡ hạt của vật liệu nano có thể xấp xỉ từ 10 đến 500, 10 đến 200, 10 đến 150, 10 đến 100, 10 đến 50, 20 đến 200, 20 đến 150, 20 đến 100, 20 đến 50, 30 đến 200, 30 đến 150, 30 đến 100, 30 đến 50, 50 đến 200, 50 đến 150, 50 đến 100, 50 đến 80, 60 đến 200, 60 đến 100, 60 đến 80, 80 đến 200, 80 đến 150, 80 đến 100, 90 đến 200, 90 đến 150, hoặc 90 đến 100 nm, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Theo một phương án theo sáng chế, cỡ hạt của vật liệu nano tốt hơn là 50 đến 80, 90 đến 200, 90 đến 150 hoặc 80 đến 100 nm. Ở đây, cỡ hạt là trung bình của các giá trị thử nghiệm đo được nhờ sử dụng tán xạ ánh sáng động hoặc các kích cỡ được thể hiện trong các hình ảnh AFM hoặc STEM, chỉ giá trị thu được khi giả định rằng vật liệu nano là hình cầu hoặc tròn.

Vật liệu nano có thể được tạo ra dưới dạng vật liệu nano cacbon hoặc mangan dioxit. Ở đây, vật liệu nano cacbon có thể được chọn từ nhóm gồm có NGO và chất dẫn xuất của nó, graphen oxit khử và chất dẫn xuất của nó, GON và tổ hợp của chúng. Theo một phương án, vật liệu nano có thể là NGO, GON hoặc mangan dioxit.

Thuật ngữ “chất dập tắt” được sử dụng ở đây chỉ vật liệu hấp thụ năng lượng

huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang bằng cách hấp thụ ánh sáng hoặc bước sóng. Hiệu ứng dập tắt xảy ra do sự tương tác giữa vật liệu huỳnh quang và vật liệu nano. Hiệu ứng dập tắt thường xảy ra khi vật liệu huỳnh quang được định vị ở khoảng cách gần, chẳng hạn, xấp xỉ 10nm hoặc ít hơn, từ vật liệu nano. Ở đây, vật liệu huỳnh quang đóng vai trò là chất cho năng lượng, và vật liệu nano đóng vai trò là chất nhận năng lượng.

Chất dập tắt có thể được điều chế bằng cách làm biến tính bề mặt của vật liệu nano bởi polyme tan được trong nước. Ở đây, polyme tan được trong nước và vật liệu nano có thể được liên hợp bằng liên kết hóa học hoặc vật lý. Liên kết hóa học có thể là liên kết amit, liên kết este hoặc liên kết ete, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, liên kết hóa học có thể đạt được thông qua chất liên kết ngang. Theo một phương án, polyme tan được trong nước và vật liệu nano có thể được liên hợp bằng cách ngẫu hợp EDC. Ngoài ra, liên kết vật lý có thể là lực hút tĩnh điện, liên kết hydro, hoặc liên kết Van der Waals, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, vật liệu nano mà được làm biến tính bề mặt bằng polyme tan được trong nước như vậy có thể được cải thiện về khả năng phân tán, tính ổn định và tính tương thích sinh học.

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất dập tắt này và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang.

Thuật ngữ “mẫu dò” được sử dụng ở đây chỉ vật liệu có khả năng gắn kết đặc hiệu với vật liệu đích. Mẫu dò có thể là mẫu dò bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có kháng thể, axit nucleic, peptit, protein và tổ hợp của chúng. Ngoài ra, vật liệu bất kỳ được biết là vật liệu có ái lực cao với vật liệu đích có thể được sử dụng. Theo một phương án, kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với epitop của protein đích để phát hiện vật liệu đích. Ngoài ra, khi axit nucleic có trình tự bổ sung với trình tự của axit nucleic của vật liệu đích, axit nucleic có thể gắn kết với trình tự bazơ đích để phát hiện vật liệu đích. Ngoài ra, peptit có thể gắn kết đặc hiệu với thụ thể hoặc phối tử biểu hiện trên bề mặt tế bào để phát hiện vật liệu đích.

Axit nucleic có thể là axit nucleic bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có ADN, ARN, mARN, miARN, ARN không mã hóa, ARN xoắn kép, ADN xoắn kép, enzym

trên cơ sở ADN, deoxyribozym, aptame, axit nucleic peptit (peptide nucleic acid - PNA), axit nucleic khóa (locked nucleic acid - ALN) và tổ hợp của chúng.

Ở đây, mặc dù axit nucleic có thể có 10 đến 50, 10 đến 30, 12 to 28, 15 đến 25, hoặc 18 đến 22 bazơ, nếu axit nucleic này có khả năng liên kết bổ sung với trình tự axit nucleic đích, không có giới hạn nào đối với số lượng bazơ. Theo một phương án, axit nucleic có thể có 15 đến 22 bazơ. Theo một phương án theo sáng chế, axit nucleic có thể là axit nucleic bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 20.

Vật liệu huỳnh quang gắn kết với mẫu dò theo sáng chế. Vật liệu huỳnh quang có mặt ở trạng thái dập tắt bởi sự hấp thu năng lượng huỳnh quang bởi vật liệu nano liên hợp polyme tan được trong nước, và khi mẫu dò được giải phóng khỏi vật liệu nano do sự gắn kết đặc hiệu với vật liệu đích, huỳnh quang được phát ra. Vật liệu huỳnh quang có thể gắn kết với một đầu hoặc giữa mẫu dò. Khi mẫu dò là axit nucleic, vật liệu huỳnh quang có thể được bố trí ở vị trí đầu 5' hoặc 3' của axit nucleic hoặc trong axit nucleic. Khi mẫu dò là peptit, vật liệu huỳnh quang có thể gắn kết với đầu tận cùng N hoặc C của peptit, hoặc trong peptit. Vật liệu huỳnh quang có thể gắn kết với mẫu dò trực tiếp hoặc qua chất liên kết ngang.

Vật liệu huỳnh quang có thể được chọn từ nhóm gồm có floresxein, floresxein clotriazinyl, rôdamin xanh lá, rôdamin đỏ, tetrametyl rôdamin, floresxein isothioxyanat (FITC), xanh Oregon, thuốc nhuộm Alexa Fluor, carboxyfloresxein (FAM), 6-carboxy-4',5'-diclo-2',7'-dimetoxylôresxein (JOE), carboxy-X-rôdamin (ROX), 6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexaclofloresxein (HEX), đỏ Texas (sulforôdamin 101 clorua axit), 6-carboxy-2',4,7',7'-tetraclofloresxein (TET), tetrametyl rôdamin -isothioxyanat (TRITC), carboxytetrametyl rôdamin (TAMRA), thuốc nhuộm gốc xyanin, thuốc nhuộm thiodicarboxyanin, và tổ hợp của chúng. Thuốc nhuộm gốc xyanin có thể được chọn từ nhóm gồm có Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 và tổ hợp của chúng.

Chất dập tắt có thể phát hiện một hoặc nhiều đích. Để phát hiện một hoặc nhiều đích, vật liệu nano có thể bao gồm hai hoặc nhiều mẫu dò khác nhau. Ở đây, mỗi mẫu dò có thể bao gồm vật liệu huỳnh quang khác nhau. Ở đây, mỗi mẫu dò có thể gắn kết vật liệu đích khác nhau để phát hiện vật liệu đích khác nhau.

Ngoài ra, chế phẩm có thể được sử dụng để cung cấp thông tin cần thiết cho việc phát hiện vật liệu sinh học hoặc việc chẩn đoán bệnh. Bệnh có thể là bệnh ung thư, bệnh truyền nhiễm, bệnh viêm, hoặc bệnh di truyền, và theo một phương án, bệnh tốt hơn là bệnh ung thư hoặc bệnh viêm.

Bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư da, u não, sacôm, bệnh ung thư mắt, bệnh ung thư tủy xương, bệnh ung thư máu và tổ hợp của chúng. Trong khi đó, bệnh truyền nhiễm có thể gây ra bởi sự nhiễm bất kỳ một trong số loài được chọn từ nhóm gồm có vi khuẩn, nấm, virus, ký sinh trùng và tổ hợp của chúng. Ở đây, vi khuẩn có thể là vi khuẩn đường ruột hoặc cầu khuẩn gram dương. Ví dụ về vi khuẩn bao gồm *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Acinetobacter baumannii*. Theo một phương án theo sáng chế, vi khuẩn tốt hơn là *Pseudomonas aeruginosa* hoặc *Staphylococcus aureus*.

Ví dụ về virus có thể bao gồm virus ADN sợi đôi, virus ADN sợi đơn, virus ARN sợi đôi, virus ARN sợi đơn dương, virus ARN sợi đơn âm, retrovirus ARN sợi đơn và retrovirus ADN sợi đôi. Theo một phương án theo sáng chế, virus có thể được chọn từ nhóm gồm có virus cytomegalo, virus sốt xuất huyết Dengue và tổ hợp của chúng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp cung cấp thông tin cần thiết để chẩn đoán bệnh, phương pháp này bao gồm các bước: trộn chế phẩm bao gồm chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang với mẫu phân lập được; đo mức huỳnh quang của hỗn hợp; và so sánh mức thu được với mức huỳnh quang của mẫu đối chứng bình thường.

Chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang, mà được bao gồm trong chế phẩm, là như được mô tả ở trên. Ngoài ra, mẫu có thể là mẫu được phân lập và lấy từ đích chẩn đoán, và có thể là tế bào, môi trường nuôi cấy tế bào, mô, nước bọt, nước tiểu, phân, tinh dịch, máu, huyết tương hoặc huyết thanh. Ngoài ra, mẫu đối chứng bình thường chỉ mẫu được phân lập và lấy từ người bình thường không mắc bệnh.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện vật liệu sinh học như axit nucleic hoặc protein, hoặc để chẩn đoán bệnh như mô tả ở trên. Ở đây, huỳnh

quang có thể được xác định bằng cách đo ánh sáng phát ra trong khi được giải phóng bởi sự tiếp xúc hoặc gắn kết đặc hiệu vật liệu huỳnh quang được dập tắt bởi vật liệu nano với vật liệu đích. Để đo mức huỳnh quang, phép trắc lưu tế bào, phân tách tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting - FACS), hoặc phương pháp phân tích tín hiệu huỳnh quang hoặc hình ảnh có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit bao gồm chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang. Chất dập tắt và mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang, mà được bao gồm trong chế phẩm, là như được mô tả ở trên. Kit có thể được sử dụng để phát hiện vật liệu sinh học như axit nucleic hoặc protein, hoặc để chẩn đoán bệnh như mô tả ở trên.

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả đầy đủ có sự tham chiếu đến các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ sau chỉ được đưa ra để làm ví dụ cho sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I. Điều chế vật liệu nano hai chiều

Ví dụ 1. Điều chế keo nano của graphen oxit (graphene oxide nanocolloid - GON)

4g $K_2S_2O_8$ và 4g P_4O_{10} được bổ sung vào 50mL H_2SO_4 và hòa tan trong khi khuấy. 2g sợi nano graphit được bổ sung vào dung dịch thu được, và làm nóng ở 90°C trong 16 giờ. Hỗn hợp làm nóng này được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, 250mL nước cất được bổ sung vào đó, tiếp theo là lọc bằng giấy lọc (Whatman-GE Healthcare, USA). Hỗn hợp tinh sạch được rửa bằng nước cất hai lần hoặc hơn và làm khô trong không khí.

1,5g sợi nano graphit loại bột khô được bổ sung vào 250mL H_2SO_4 , 10g $KMnO_4$ được bổ sung từ từ vào đó, và cho phản ứng trong khi khuấy. Ở đây, nhiệt độ phản ứng không vượt quá 10°C. Sản phẩm phản ứng được làm ấm lên trong nước cất 35°C để phản ứng thêm trong khi khuấy trong 6 giờ. Sau phản ứng, 1.000mL nước cất được bổ sung, và lúc này, nhiệt độ được duy trì ở 55°C hoặc thấp hơn. 50mL H_2O_2 được bổ sung vào hỗn hợp để cho phép phản ứng, và hỗn hợp thu được được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 30 phút, nhờ đó thu được viên vón. Viên vón thu được được

rửa bằng HCl 3,4% (trọng lượng/trọng lượng) và axeton ba lần hoặc hơn nhờ sử dụng máy ly tâm.

Axeton chứa trong phần nổi màu hơi nâu thu được cuối cùng được loại bỏ trong chân không, và nước cất được bổ sung vào dung dịch còn lại để điều chỉnh nồng độ cuối đến 1 mg/mL, tiếp theo là trộn xoáy để tạo huyền phù hoàn toàn. Sản phẩm thu gom được tinh chế và trung hòa nhờ sử dụng màng thẩm tách 10.000Da, và sản phẩm cuối được làm khô lạnh để thu được GON dạng bột. GON thu được được quan sát nhờ sử dụng AFM, và kết quả được thể hiện trên Fig.2. Như được thể hiện trên Fig.2, thu được GON có kích cỡ 100nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 2nm hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ 2. Điều chế mangan dioxit (MnO_2)

Nước cất được bổ sung vào dung dịch chứa 32mL natri dodecyl sulfat (SDS) và 1,6mL H_2SO_4 để điều chỉnh thể tích cuối đến 300mL. Dung dịch thu được được làm nóng ở 95°C trong 15 phút, và sau đó 3,2mL dung dịch KMnO_4 được bổ sung nhanh vào đó. Sau đó, tiếp tục làm nóng trong 60 phút, và thu được phiến mangan dioxit màu nâu tối.

Nước cất ba lần và rượu được bổ sung ở tỉ lệ thể tích 1:1 vào phiến mangan dioxit thu được, và ly tâm ở 12.000 vòng trên phút, nhờ đó thu được viên vón. Ngoài ra, việc ly tâm được thực hiện hai lần trong cùng điều kiện để cho phép sản phẩm thu được được huyền phù lại trong nước cất ba lần, từ đó thu được sản phẩm cuối. MnO_2 thu được được quan sát bằng STEM và AFM, và kết quả được thể hiện trên Fig.3. Như được thể hiện trên Fig.3b, thu được MnO_2 có kích cỡ 200nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 2nm hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ 3. Điều chế graphen oxit nano (NGO)

0,5g Na_2NO_3 được bổ sung vào 23mL H_2SO_4 và hòa tan trong khi khuấy. 0,5g sợi nano graphite được bổ sung vào dung dịch thu được, và sau đó 3g KMnO_4 được bổ sung từ từ vào đó trong khi khuấy để cho phép phản ứng. Ở đây, nhiệt độ phản ứng không vượt quá 10°C. Sản phẩm phản ứng được làm ấm lên trong nước cất 35°C để phản ứng thêm trong khi khuấy trong 1 giờ, và sau đó được cho phản ứng thêm ở nhiệt độ 90°C trong 30 phút. Sau phản ứng, 1mL nước cất được bổ sung, và nhiệt độ được duy trì ở 55°C hoặc thấp hơn. 3mL H_2O_2 được bổ sung vào các sản phẩm phản

ứng để cho phép phản ứng, làm mát đến nhiệt độ trong phòng, và sau đó 250mL nước cất được bổ sung vào đó. Sau khi dung dịch thu được được lọc nhờ sử dụng giấy lọc, chất lọc thu được từ đó được rửa bằng nước cất hai lần hoặc hơn và làm khô trong không khí.

Để điều chế graphen oxit (GO), 50mL NaOH 9M được bổ sung vào dung dịch graphen oxit 10 mg/mL, tiếp theo là nhúng que sóng âm trong 90 phút. Graphen oxit được tinh chế và trung hòa nhờ sử dụng màng thẩm tách 3.800 Da, và sản phẩm cuối được làm khô lạnh để thu được NGO loại bột. NGO thu được được quan sát nhờ sử dụng AFM, và kết quả được thể hiện trên Fig.4. Như được thể hiện trên Fig.4, thu được NGO có kích cỡ 200nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 1,5nm hoặc nhỏ hơn.

II Điều chế vật liệu nano hai chiều được làm biến tính bề mặt bằng polyme

Ví dụ 4. Điều chế GON được làm biến tính bề mặt bằng dextran (DReGON)

Bề mặt của GON thu được ở Ví dụ 1 được làm biến tính bằng dextran. Cụ thể, 50mg GON được tạo huyền phù trong 50mL nước cất, và dung dịch dextran chứa nước nồng độ 0,1% (trọng lượng/trọng lượng) được bổ sung vào đó. Hỗn hợp được đưa vào siêu âm trong 30 phút, và sau đó cho phản ứng với 25 μ L dung dịch amoniac chứa nước ở 95°C trong 3 giờ trong khi khuấy. Sản phẩm phản ứng được rửa bằng nước cất, tách bằng ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 30 phút, và làm khô lạnh, nhờ đó thu được sản phẩm cuối DReGON.

Phân tích Raman được thực hiện nhờ sử dụng DReGON thu được. Cụ thể, DReGON được đặt vào lát silicon, và sau đó lát silicon được gắn vào máy đo phổ Raman (LabRAM HR UV/vis/NIR), tiếp theo là phân tích phổ bằng cách chiếu xạ laze CW 514 nm.

Kết quả quan sát DReGON thu được bởi AFM được thể hiện trên Fig.5a, và kết quả phân tích phổ Raman được thể hiện trên Fig.5b. Như được thể hiện trên Fig.5a, thu được DReGON có kích cỡ 100nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 7nm hoặc nhỏ hơn. Đồng thời, như được thể hiện trên Fig.5b, quan sát được các đỉnh D và G lần lượt ở 1370 cm^{-1} và 1600 cm^{-1} , và tỉ số ID/IG là 0,85.

Ví dụ 5. Điều chế NGO được làm biến tính bề mặt bằng polyetylen glycol (PEG)

Bề mặt của NGO thu được ở ví dụ 3 được làm biến tính bằng PEG. Cụ thể, 5mg NGO được trộn với cùng lượng PEG (10 kDa), tiếp theo là xử lý bằng chiếu sáng âm. Sau khi bổ sung 5mg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), thực hiện xử lý bằng chiếu sáng âm cho hỗn hợp thêm trong 5 phút. Sau khi được khuấy trong 6 giờ, hỗn hợp được tinh chế và trung hòa nhờ sử dụng màng thẩm tách 10.000 Da, và sản phẩm cuối được làm khô lạnh, từ đó thu được NGO dạng bột mà được làm biến tính bề mặt bằng PEG (PEG-NGO).

PEG-NGO thu được được quan sát bằng AFM, và kết quả được thể hiện trên Fig.6a. Như được thể hiện trên Fig.6a, thu được PEG-NGO có kích cỡ 200nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 1nm hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ 6. Điều chế GON được làm biến tính bề mặt bằng polyetylen glycol và polyetylenimide (PEI)

Bề mặt của GON thu được ở ví dụ 1 được làm biến tính bằng PEG và PEI. Cụ thể, 20mg PEG (10 kDa) được bổ sung vào 10mL dung dịch GON 2mg/mL, tiếp theo là xử lý bằng chiếu sáng âm trong 5 phút. Nhờ bổ sung 20mg EDC, việc xử lý bằng chiếu sáng âm cho hỗn hợp được thực hiện thêm trong 5 phút. Xử lý bằng chiếu sáng âm được thực hiện trong 5 phút mỗi lần sau đó bổ sung 10mg PEI và EDC vào sản phẩm phản ứng, tiếp theo là khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ để cho phép phản ứng đồng nhất. Sau đó, hỗn hợp được tinh chế và trung hòa nhờ sử dụng màng thẩm tách 12.000 Da, và sản phẩm cuối được làm khô lạnh, từ đó thu được GON dạng bột mà được làm biến tính bề mặt bằng PEG và PEI (PEG-PEI-GON).

PEG-PEI-GON thu được được quan sát bằng AFM, và kết quả được thể hiện trên Fig.6b. Như được thể hiện trên Fig.6b, thu được PEG-PEI-GON có kích cỡ 100nm hoặc nhỏ hơn và độ dày 10nm hoặc nhỏ hơn.

III. Xác nhận điều chế chế phẩm vật liệu nano hai chiều được làm biến tính bề mặt bằng polyme để phát hiện vật liệu đích

Ví dụ thử nghiệm 1. Xác nhận điều chế chế phẩm vật liệu nano hai chiều được làm biến tính bề mặt bằng polyme để phát hiện vật liệu đích

Ví dụ thử nghiệm 1-1. Xác nhận điều chế chế phẩm DReGON để phát hiện vật liệu đích-(1)

Để xác nhận liệu DReGON được điều chế trong ví dụ 4 có thể được sử dụng làm chế phẩm để phát hiện vật liệu đích hay không, tiến hành thử nghiệm như sau. Cụ thể, mẫu dò axit nucleic peptit (PNA) để phát hiện vật liệu đích được điều chế bằng cách yêu cầu Panagene (Hàn Quốc) gắn nhãn Cy5 ở đầu 5', và bao gồm hai đơn vị, dưới dạng cầu nối, trong đó hai nguyên tử cacbon được gắn vào một nguyên tử oxy giữa Cy5 và trình tự mẫu dò. 1µm mẫu dò PNA được bổ sung vào 20µL nước không chứa nucleaza, và hòa tan hoàn toàn bằng cách làm nóng ở 80°C trong xấp xỉ 3 phút. 20µL mẫu dò PNA hòa tan được trộn với DReGON được điều chế trong ví dụ 4, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Bốn, tám, mười hai hoặc hai bốn giờ sau khi phản ứng, tín hiệu huỳnh quang được đo nhờ sử dụng máy đọc huỳnh quang ở Ex/Em=647/670 nm. Ở đây, chỉ mẫu dò PNA được sử dụng làm đối chứng.

Kết quả là, cho rằng tín hiệu huỳnh quang của mẫu dò PNA là 100%, khi mẫu dò PNA được cho phản ứng với vật liệu nano hai chiều mà được làm biến tính bề mặt bằng polyme, tín hiệu huỳnh quang bị giảm ít hơn 5%, và do đó xác nhận rằng vật liệu tạo ra chế phẩm phát hiện.

Ví dụ thử nghiệm 1-2. Xác nhận điều chế chế phẩm DReGON để phát hiện vật liệu đích-(2)

Để xác nhận liệu DReGON được điều chế trong ví dụ 4 có thể được sử dụng làm chế phẩm để phát hiện vật liệu đích hay không, thử nghiệm được thực hiện trong cùng điều kiện và cùng cách như ví dụ thử nghiệm 1-1. Ở đây, đối với mẫu dò PNA, PNA-US5-2 hoặc PNA-DENV liệt kê trong bảng 2 được sử dụng. 10pmol mẫu dò PNA được trộn với từng lượng gồm 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 hoặc 1,6µg DReGON. Kết quả là, trị số tín hiệu huỳnh quang đo được được thể hiện trên Fig.7. Như được thể hiện trên Fig.7, sự giảm tín hiệu huỳnh quang phụ thuộc vào nồng độ của mẫu dò PNA được bổ sung, và do đó xác nhận rằng vật liệu này tạo ra chế phẩm phát hiện.

Ví dụ thử nghiệm 1-3. Xác nhận điều chế chế phẩm PEG-NGO để phát hiện vật liệu đích

Để xác nhận liệu PEG-NGO được điều chế trong ví dụ 5 có thể được sử dụng làm chế phẩm để phát hiện vật liệu đích hay không, thử nghiệm được thực hiện trong cùng điều kiện và cùng cách như ví dụ thử nghiệm 1-1. Ở đây, 10pmol mẫu dò PNA

được trộn với từng lượng gồm 0, 0,1, 0,2, 0,5 hoặc 1,0 μ g PEG-NGO. Đối với mẫu dò PNA, mẫu dò trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang Cy5 được gắn vào PNA-Sa hoặc PNA-Pa, liệt kê trong bảng dưới đây, được sử dụng. Kết quả là, trị số tín hiệu huỳnh quang đo được được thể hiện trên Fig.8. Như được thể hiện trên Fig.8, sự giảm tín hiệu huỳnh quang phụ thuộc vào nồng độ của mẫu dò PNA được bổ sung, và do đó xác nhận rằng vật liệu này tạo ra chế phẩm phát hiện.

Ví dụ thử nghiệm 1-4. Xác nhận điều chế chế phẩm PEG-PEI-GON để phát hiện vật liệu đích

Để xác nhận liệu PEG-PEI-NGO được điều chế trong ví dụ 6 có thể được sử dụng làm chế phẩm để phát hiện vật liệu đích hay không, thử nghiệm được thực hiện trong cùng điều kiện và cùng cách như ví dụ thử nghiệm 1-1. 10pmol mẫu dò PNA được trộn với từng lượng gồm 0, 0,1, 0,2, 0,5 hoặc 1,0 μ g PEG-PEI-NGO. Đối với mẫu dò PNA, mẫu dò trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang FITC được gắn vào PNA-TS liệt kê trong bảng 1 dưới đây được sử dụng. Kết quả là, trị số tín hiệu huỳnh quang đo được được thể hiện trên Fig.9. Như được thể hiện trên Fig.9, sự giảm tín hiệu huỳnh quang phụ thuộc vào nồng độ của mẫu dò PNA được bổ sung, và do đó xác nhận rằng vật liệu này tạo ra chế phẩm phát hiện.

Ví dụ thử nghiệm 2. Xác nhận tính ổn định của các hạt DReGON

Để xác nhận tính ổn định của các hạt DReGON được điều chế trong ví dụ 4, tiến hành thử nghiệm như sau. Cụ thể, dung dịch DReGON nồng độ 0,1mg/mL được tạo huyền phù kỹ trong dung dịch PBS chứa huyết thanh, và giữ trong 0, 4, 8, 12 hoặc 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng, tiếp theo là đo độ hấp thụ theo thời gian. Để làm đối chứng, GON được điều chế trong ví dụ 1 được sử dụng. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.10, DReGON (b) thể hiện phổ hấp thụ ổn định hơn trong môi trường hoạt động sinh lý học trong khoảng thời gian dài so với GON (a), và sự phân tán ổn định này được giữ trong 24 giờ hoặc lâu hơn.

IV. Xác nhận khả năng phát hiện vật liệu đích của vật liệu nano hai chiều được làm biến tính bề mặt bằng polyme

Ví dụ thử nghiệm 3 Xác nhận khả năng phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu tế bào ung thư

Ví dụ thử nghiệm 3-1. Xác nhận khả năng phát hiện của DReGON

Để đo giới hạn phát hiện của DReGON được điều chế trong ví dụ 4, tiến hành thử nghiệm như sau. Đầu tiên, PNA21 và DReGON được trộn làm mẫu dò và cho phản ứng trong cùng điều kiện và cùng cách thức như ở ví dụ thử nghiệm 1-1. Ba mươi phút sau phản ứng, vật liệu đích bao gồm trình tự đặc hiệu tế bào ung thư, tức là, miR-21, được bổ sung vào sản phẩm phản ứng để có nồng độ 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 hoặc 1.000 nM, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Các tín hiệu huỳnh quang được đo nhờ sử dụng máy đọc huỳnh quang ở Ex/Em=647/670 nm. Các trình tự của mẫu dò PNA và vật liệu đích sử dụng trong thử nghiệm được liệt kê trong các bảng 1 và 2 dưới đây.

Bảng 1

Bệnh đích	Mẫu dò	Trình tự (5'→3')	SEQ ID NO:
Bệnh ung thư	PNA21	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA	SEQ ID NO: 1
	PNA31	AGCTATGCCAGCATCTTGCCT	SEQ ID NO: 2
	PNA223	ATTTGACAAACTGAC	SEQ ID NO: 3
	PNA484	GGAGGGGACTGAGCCTG	SEQ ID NO: 4
	Let-7a	AACTATAACAACCTACTACCTCA	SEQ ID NO: 5
	PNA-TS	CTGCCCCAAAATGCCT	SEQ ID NO: 6
Bệnh do vi khuẩn	PNA-Pa	GCGGCATGGCTGGATC	SEQ ID NO: 7
	PNA-Sa	ACAGAGTTTTACGATC	SEQ ID NO: 8
Bệnh do virus	PNA-US5-2	AGACATCGTCACACCTATCATA	SEQ ID NO: 9
	PNA-DENV	GCGTTTCAGCATATTGA	SEQ ID NO: 10

Bảng 2

Bệnh đích	Vật liệu đích	Trình tự (5'→3')	SEQ ID NO:
Bệnh ung thư	miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	SEQ ID NO: 11
	miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	SEQ ID NO: 12
	miR-223	GUCAGUUUGUCAAU	SEQ ID NO: 13
	miR-484	CAGGCUCAGUCCCCUCC	SEQ ID NO: 14
	Let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	SEQ ID NO: 15

	miR-TS	AGGCAUUUUGGGGCAG	SEQ ID NO: 16
Bệnh do vi khuẩn	miR-Pa	GAUCCAGCCAUGCCGC	SEQ ID NO: 17
	miR-Sa	GAUCGUAAAACUCUGU	SEQ ID NO: 18
Bệnh do virus	miR-US5-2	UAUGAUAGGUGUGACGAUGUCU	SEQ ID NO: 19
	miR-DENV	UCAAUAUGCUGAAACGC	SEQ ID NO: 20

Các kết quả thu được bằng cách thể các thay đổi về huỳnh quang trước và sau khi bổ sung vật liệu đích vào phương trình 1 dưới đây được thể hiện trên Fig.11. Ở đây, để làm đối chứng, GON được điều chế trong ví dụ 1 được sử dụng.

[Phương trình 1]

$$\text{Giới hạn phát hiện} = 3,3\left(\frac{SD}{S}\right)$$

*SD: Độ lệch chuẩn, S: Độ dốc của đường hiệu chỉnh

Như được thể hiện trên Fig.11, GON phát hiện được lên đến 230pM vật liệu đích, nhưng DReGON phát hiện được lên đến 10 pM vật liệu đích. Từ kết quả này, xác nhận rằng vật liệu nano hai chiều mà được làm biến tính bề mặt bằng polyme theo sáng chế có thể còn phát hiện axit nucleic đích có mặt ở nồng độ thấp trong mẫu.

Ví dụ thử nghiệm 3-2. Xác nhận khả năng phát hiện của PEG-NGO

Khả năng của PEG-NGO để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu tế bào ung thư được xác nhận trong cùng điều kiện và cách thức như ví dụ thử nghiệm 3-1. Ở đây, 10 pmol PEG-NGO được điều chế trong ví dụ 5, thay vì DReGON, được sử dụng, và PNA21 và PNA233 làm mẫu dò và miR-21 và miR-233 làm vật liệu đích được sử dụng ở 0, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, 200 hoặc 2.000nM. Ngoài ra, sau khi vật liệu đích được bổ sung, phản ứng được thực hiện trong 4 giờ, sự thay đổi huỳnh quang được đo ở thời gian cách quãng 20 phút, và kết quả được thể hiện trên Fig.12. Như được thể hiện trên Fig.12, do nồng độ của vật liệu đích tăng, tín hiệu huỳnh quang trở nên mạnh hơn, và huỳnh quang được phục hồi đến các mức khác nhau theo nồng độ và loại mẫu dò.

Ví dụ thử nghiệm 3-3. Xác nhận khả năng phát hiện của PEG-PEI-GON

Khả năng của PEG-PEI-NGO để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu tế bào ung thư được xác nhận trong cùng điều kiện và cách thức như ví dụ thử nghiệm 3-1. Ở đây, 10pmol PEG-PEI-NGO được điều chế trong ví dụ 6, thay vì DReGON, được sử dụng, và PNA-TS làm mẫu dò và miR-TS làm vật liệu đích được sử dụng ở 100, 200, 300 hoặc 500 nM. Ngoài ra, sau khi vật liệu đích được bổ sung, phản ứng được thực hiện trong 4 giờ, sự thay đổi huỳnh quang được đo ở thời gian cách quãng 20 phút, và kết quả được thể hiện trên Fig.13. Như được thể hiện trên Fig.13, do nồng độ của vật liệu đích tăng, tín hiệu huỳnh quang trở nên mạnh hơn, và huỳnh quang được phục hồi ở mức khác nhau theo nồng độ và loại mẫu dò.

Ví dụ thử nghiệm 3-4. Xác nhận khả năng phát hiện của DReGON ở các dòng tế bào ung thư

Khả năng của DReGON để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu tế bào ung thư được xác nhận nhờ sử dụng các loại dòng tế bào ung thư khác nhau. Đầu tiên, các dòng tế bào MCF-7, HeLa và SW620 được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy trong môi trường DMEM hoặc RPMI. Tuy nhiên, PNA484 hoặc PNA31 làm mẫu dò được trộn với DReGON trong cùng điều kiện và cùng cách thức như ở ví dụ thử nghiệm 1-1 để cho phép phản ứng. Các tế bào được chuẩn bị được cấy vào đĩa 12 lỗ để có mật độ 1×10^5 tế bào mỗi lỗ, và sau 24 giờ, sản phẩm phản ứng của DReGON, và PNA484 hoặc PNA31 được bổ sung vào các tế bào ở nồng độ 80pmol.

Sau 14 giờ, hình ảnh tín hiệu huỳnh quang của các tế bào quan sát được nhờ sử dụng kính hiển vi huỳnh quang được thể hiện trên Fig.15. Ở đây, để làm đối chứng, ảnh chụp không bổ sung mẫu dò vào các tế bào được thể hiện trên Fig.14. Như được thể hiện trên Fig.15, sự phát hiện vật liệu đích bởi DReGON được xác nhận qua tín hiệu huỳnh quang của mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang.

Ví dụ thử nghiệm 3-5. Xác nhận khả năng phát hiện của DReGON ở các tế bào máu

Để xác nhận khả năng phát hiện của DReGON đối với trình tự bazơ đặc hiệu có mặt ở các tế bào máu, tiến hành thử nghiệm như sau. Cụ thể, các tế bào máu được thu nhận từ 10mL máu của người khỏe mạnh bằng phương pháp đã biết, và nuôi cấy trong môi trường RPMI. Các tế bào nuôi cấy này được cố định và 200nM mẫu dò PNA với 3,0 μ g DReGON và thuốc nhuộm huỳnh quang Cy5 gắn vào đó được bổ

sung. Ở đây, để làm mẫu dò PNA, PNA21, PNA223, Let-7a hoặc hỗn hợp của chúng (trộn lẫn) được sử dụng. Để làm đối chứng, nhóm tế bào không được xử lý được sử dụng.

Sau 4 giờ, cường độ huỳnh quang khôi phục ở các tế bào máu, phát hiện bằng phép trắc lưu tế bào, được thể hiện trên Fig.16. Như được thể hiện trên Fig.16, xác nhận rằng trình tự bazơ đích được biểu hiện ở các tế bào máu được phát hiện bằng mẫu dò PNA.

Ví dụ thử nghiệm 4. Xác nhận khả năng của PEG-NGO để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu vi khuẩn

Khả năng của PEG-NGO để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* hoặc *Staphylococcus aureus* được xác nhận trong cùng điều kiện và cách thức như ví dụ thử nghiệm 3-1. Ở đây, 0,2µg PEG-NGO được điều chế trong ví dụ 5, thay vì DReGON, và 10pmol PNA-Pa hoặc PNA-Sa được bổ sung, và sau đó 0, 10, 20, 40, 70 hoặc 100nM AS-ADN của *Pseudomonas aeruginosa* hoặc *Staphylococcus aureus* được bổ sung vào đó làm vật liệu đích. Kết quả là, sự thay đổi huỳnh quang đo được được thể hiện trên Fig.17. Như được thể hiện trên Fig.17, cường độ huỳnh quang tăng lên phụ thuộc vào nồng độ của AS-ADN của *Pseudomonas aeruginosa* hoặc *Staphylococcus aureus* được bổ sung.

Ví dụ thử nghiệm 5. Xác nhận khả năng DReGON để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu virus

Khả năng của DReGON để phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu virus cytomegalo của người (HCMV) hoặc virus sốt dengue (DENV) được xác nhận trong cùng điều kiện và cách thức như ví dụ thử nghiệm 3-1. Ở đây, 0,5µg DReGON, và 20pmol PNA-US5-2 hoặc PNA-DENV được bổ sung, và 20pmol miR-US5-2 hoặc miR-DENV được bổ sung vào đó làm vật liệu đích. Kết quả là, các thay đổi huỳnh quang đo được theo thời gian phản ứng được thể hiện trên Fig.18. Như được thể hiện trên Fig.18, cường độ huỳnh quang đối với trình tự axit nucleic đặc hiệu HCMV hoặc DENV bổ sung phụ thuộc vào thời gian phản ứng được tăng lên.

Vì vậy, từ các kết quả này, có thể chứng minh rằng, không giống vi mảng (microarray) hoặc RT-PCR, chế phẩm theo sáng chế dễ dàng phát hiện trình tự đích,

và có thể được sử dụng để xác nhận gián tiếp nồng độ của trình tự đích.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: tcaacatcag tctgataagc ta

SEQ ID NO: 2: agctatgccg gcattctgcc t

SEQ ID NO: 3: atttgacaaa ctgac

SEQ ID NO: 4: ggaggggact gaggcctg

SEQ ID NO: 5: aactatacaa cctactacct ca

SEQ ID NO: 6: ctgccccaaa atgcct

SEQ ID NO: 7: gcggcatggc tggatc

SEQ ID NO: 8: acagagtttt acgac

SEQ ID NO: 9: agacatcgct acacctatca ta

SEQ ID NO: 10: gcgtttcagc atattga

SEQ ID NO: 11: uagcuuauca gacugauguu ga

SEQ ID NO: 12: aggcaagaug cuggcauagc u

SEQ ID NO: 13: gucaguuguu caaau

SEQ ID NO: 14: caggcucagu cccucc

SEQ ID NO: 15: ugagguagua gguuguauag uu

SEQ ID NO: 16: aggcauuuug gggcag

SEQ ID NO: 17: gaucagacca ugccgc

SEQ ID NO: 18: gaucguaaaa cucugu

SEQ ID NO: 19: uaugauaggu gugacgaugc cu

SEQ ID NO: 20: ucaauaugcu gaaacgc

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Lemonex Inc.	
<120>	CHẾ PHẨM CHỨA CHẤT DẬP TẮT VÀ MẪU DÒ LIÊN HỢP VẬT LIỆU HUỖNH QUANG, PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NÀY	
<130>	PCB603020LMN	
<150>	KR 10-2015-0139174	
<151>	2015-10-02	
<160>	20	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PNA21	
<400>	1	
	tcaacatcag tctgataagc ta	22
<210>	2	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PNA31	
<400>	2	
	agctatgccca gcatcttgcc t	2
	1	
<210>	3	
<211>	15	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	PNA223	
<400>	3	
	atttgacaaa ctgac	15
<210>	4	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>
 <223> PNA484
 <400> 4
 ggaggggact ggcctg 17
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Let-7a
 <400> 5
 aactatacaa cctactacct ca 22
 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> PNA-TS
 <400> 6
 ctgccccaaa atgcct 16
 <210> 7
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> PNA-Pa
 <400> 7
 gcggcatggc tggatc 16
 <210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> PNA-Sa
 <400> 8
 acagagtttt acgatc 16
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PNA-US5-2
 <400> 9
 agacatcgtc acacctatca ta 22
 <210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> PNA-DENV
 <400> 10
 gcgttttcagc atattga 17
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-21
 <400> 11
 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-31
 <400> 12
 aggcaagaug cuggcauagc u 21
 <210> 13
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-223
 <400> 13
 gucaguuugu caaau 15
 <210> 14
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miR-484
 <400> 14
 caggcucagu cccucc 17
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Let-7a
 <400> 15
 ugagguagua gguuguauag uu 22
 <210> 16
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-TS
 <400> 16
 aggcauuuug gggcag 16
 <210> 17
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-Pa
 <400> 17
 gauccagcca ugccgc 16
 <210> 18
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miR-Sa
 <400> 18
 gaucguaaaa cucugu 16
 <210> 19
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miR-US5-2
<400> 19
uauagauaggu gugacgaugu cu 22
<210> 20
<211> 17
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> miR-DENV
<400> 20
ucaauaugcu gaaacgc 17

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bao gồm:

keo nano của graphen oxit (graphene oxide nanocolloid - GON);

polyme tan được trong nước liên kết với gốc nhóm carboxylic trên bề mặt của GON; và

mẫu dò liên hợp vật liệu huỳnh quang được gắn kết trên bề mặt nơi mà polyme tan được trong nước không được liên kết với GON,

trong đó polyme tan được trong nước được chọn từ nhóm gồm có chitosan, chất dẫn xuất của chitosan, muối chitosan, dextran, chất dẫn xuất của dextran, axit hyaluronic, chất dẫn xuất của axit hyaluronic, hyaluronat, pectin, chất dẫn xuất của hyaluronat, pectin, muối pectin, alginat, chất dẫn xuất của alginat, axit alginic, aga, galactomanan, chất dẫn xuất của galactomanan, muối galactomanan, xantan, chất dẫn xuất của xantan, muối xantan, β -cyclodextrin, chất dẫn xuất của β -cyclodextrin, β -cyclodextrinat, polyetylen glycol (PEG), polyetylenimin (PEI) và tổ hợp của chúng.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó GON có cỡ hạt là từ 0,01 đến 1 μ m.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó polyme được liên kết bằng liên kết hóa học hoặc liên kết vật lý.

4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó liên kết hóa học là ngẫu hợp EDC.

5. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó liên kết vật lý là liên kết hydro.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó mẫu dò là mẫu dò bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có kháng thể, axit nucleic, peptit, protein và tổ hợp của chúng.

7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó axit nucleic gồm có 10 đến 50 bazơ.

8. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó axit nucleic là axit nucleic bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có ADN, ARN, mARN, miARN, ARN không mã hóa, ARN xoắn kép, ADN xoắn kép, enzym trên cơ sở ADN, deoxyribozym, aptame, axit nucleic peptit (peptide nucleic acid - PNA), axit nucleic khóa (locked nucleic acid - LNA) và tổ hợp của chúng.

9. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó axit nucleic là axit nucleic bất kỳ được chọn từ

nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 10.

10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó vật liệu huỳnh quang được chọn từ nhóm gồm có floresxein, floresxein clotriaziny, rôdamin xanh lá, rôdamin đỏ, tetrametyl rôdamin, floresxein isothioxyanat (FITC), xanh Oregon, thuốc nhuộm Alex Fluor, carboxyfloresxein (FAM), 6-carboxy-4',5'-diclo-2',7'-dimetoxylôresxein (JOE), carboxy-X-rôdamin (ROX), 6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexaclofloresxein (HEX), đỏ Texas (sulforôdamin 101 clorua axit), 6-carboxy-2',4,7,7-tetraclofloresxein (TET), tetrametyl rôdamin-isothioxyanat (TRITC), carboxytetrametyl rôdamin (TAMRA), thuốc nhuộm gốc xyanin, thuốc nhuộm thiodicarbocyanin, và tổ hợp của chúng.

11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó thuốc nhuộm gốc xyanin là thuốc nhuộm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 và tổ hợp của chúng.

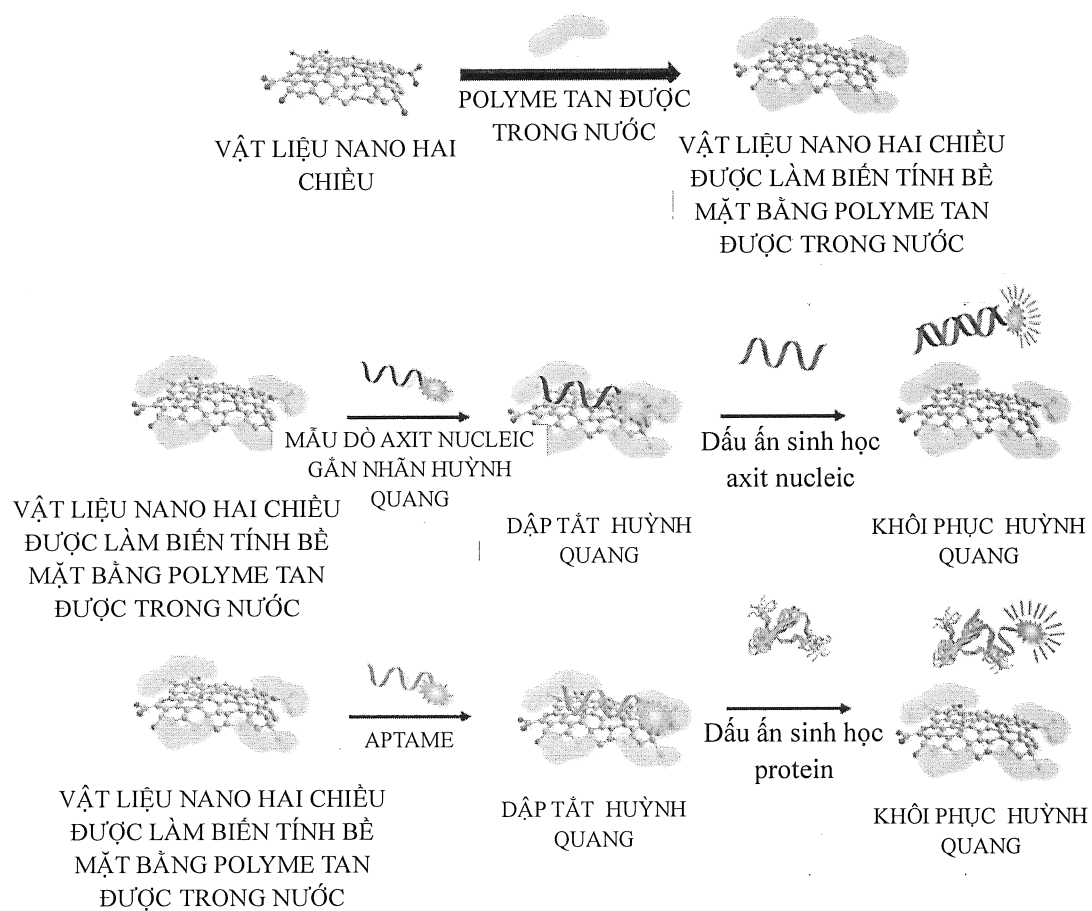
12. Phương pháp cung cấp thông tin cần thiết cho việc chẩn đoán bệnh bao gồm các bước:

- 1) trộn chế phẩm theo điểm 1 với mẫu phân lập được;
- 2) đo mức huỳnh quang của hỗn hợp; và
- 3) so sánh mức thu được với mức huỳnh quang của mẫu đối chứng bình thường.

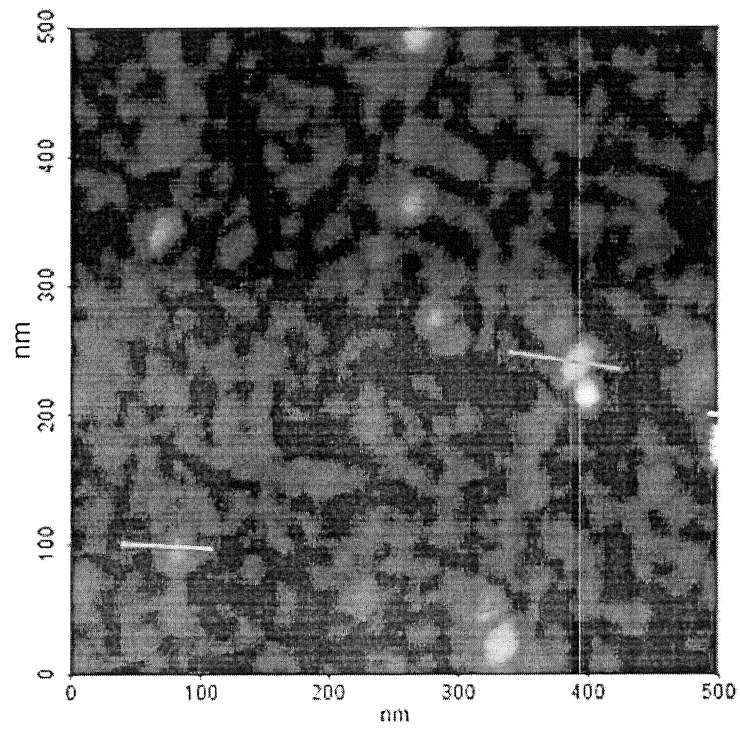
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bệnh là bệnh ung thư, bệnh truyền nhiễm, bệnh viêm hoặc bệnh di truyền.

14. Kit chứa chế phẩm theo điểm 1.

[FIG. 1]

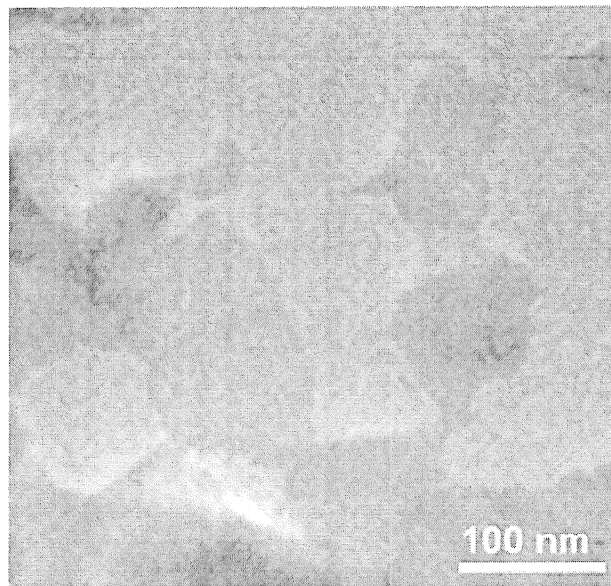


[FIG. 2]

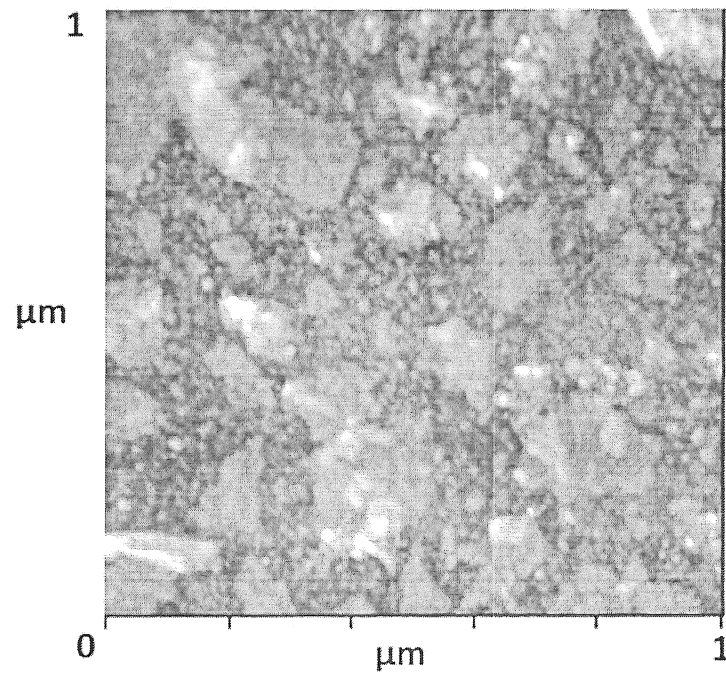


[FIG. 3]

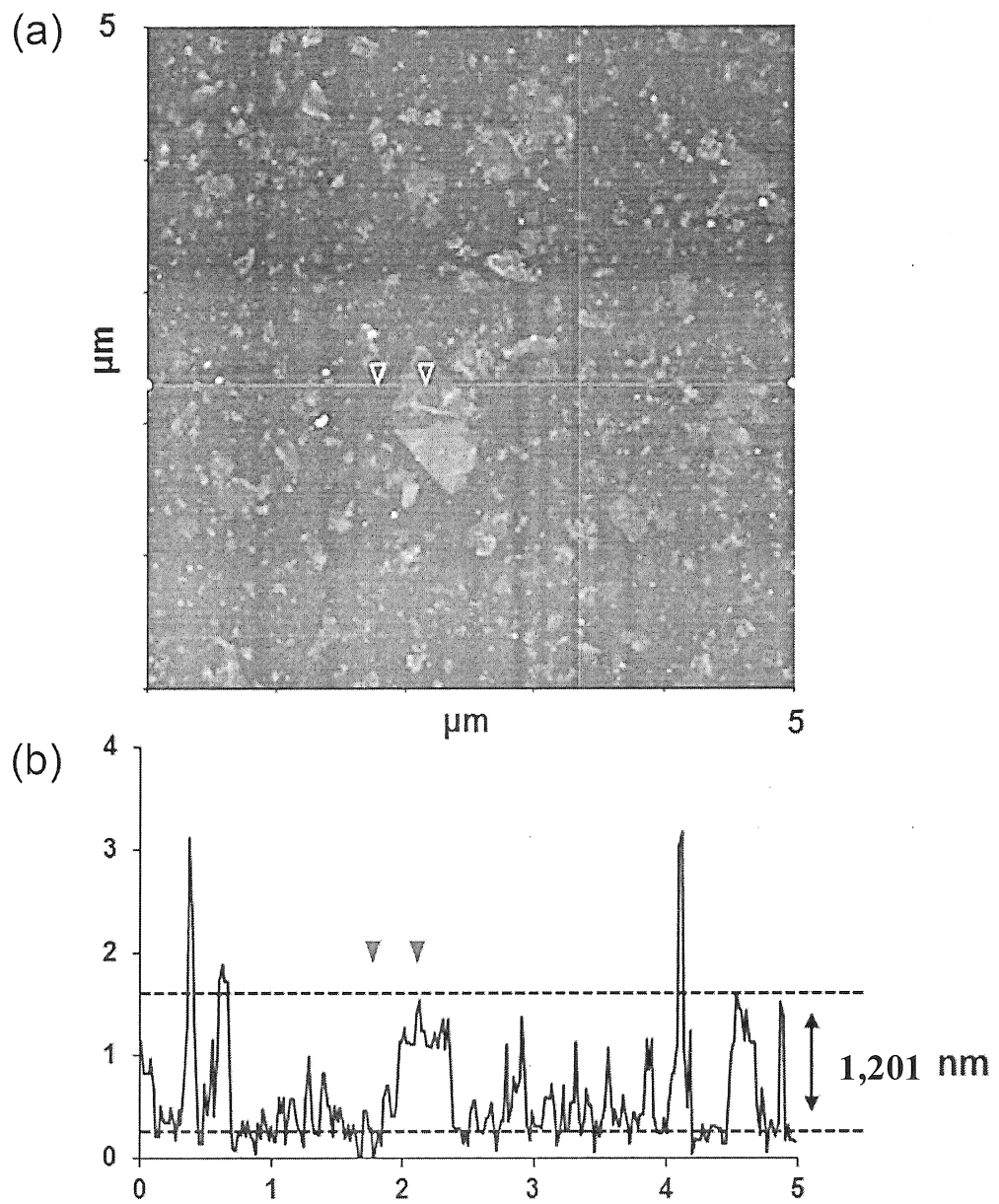
(a)



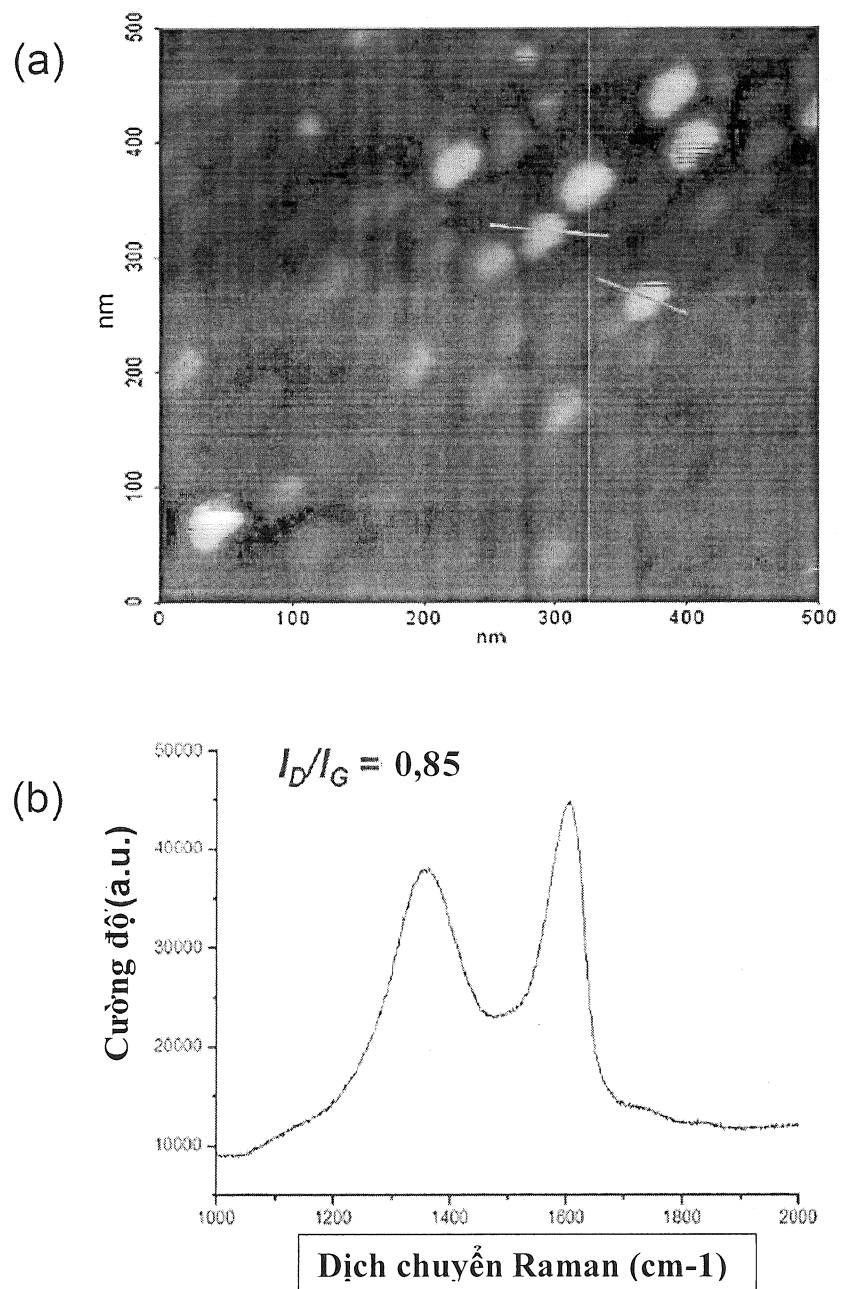
(b)



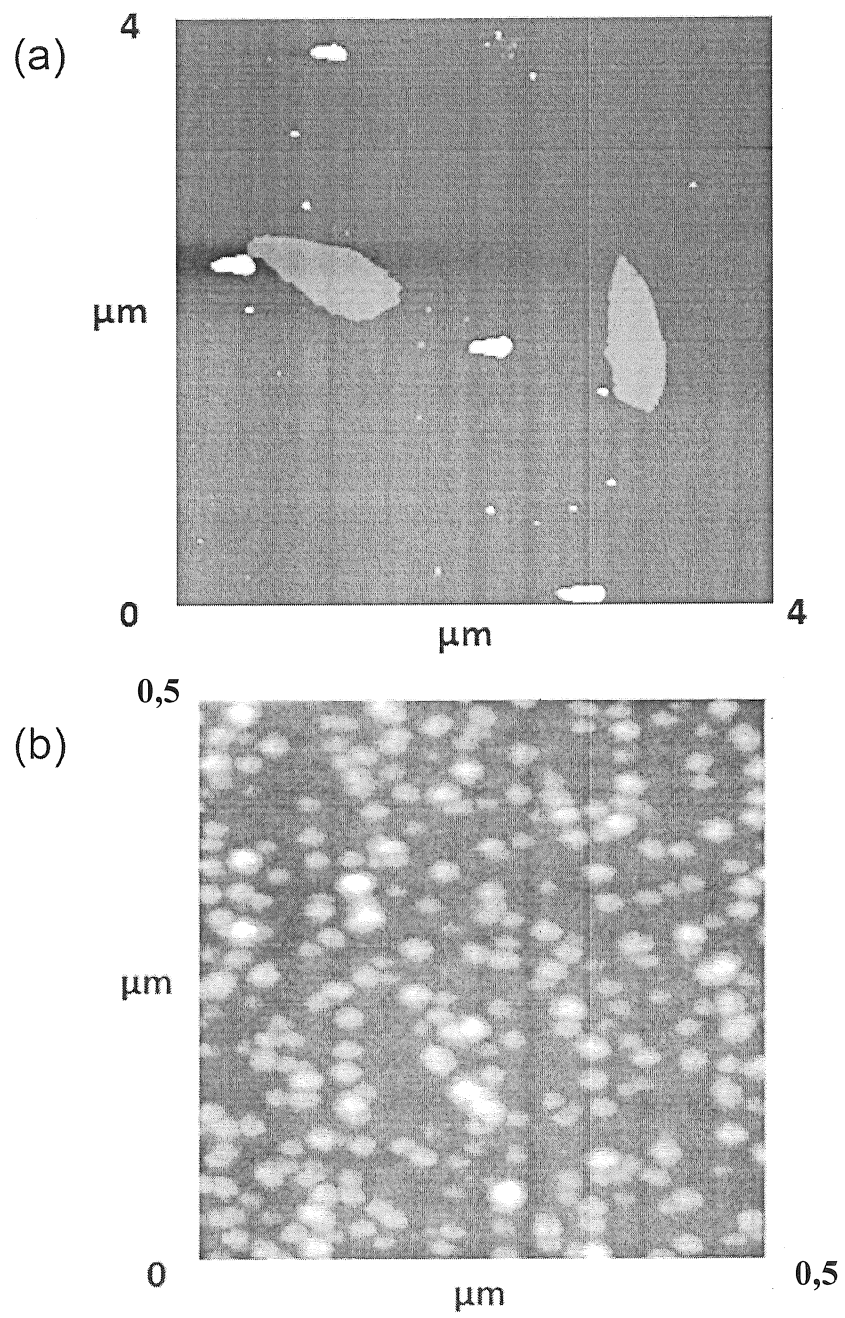
[FIG. 4]



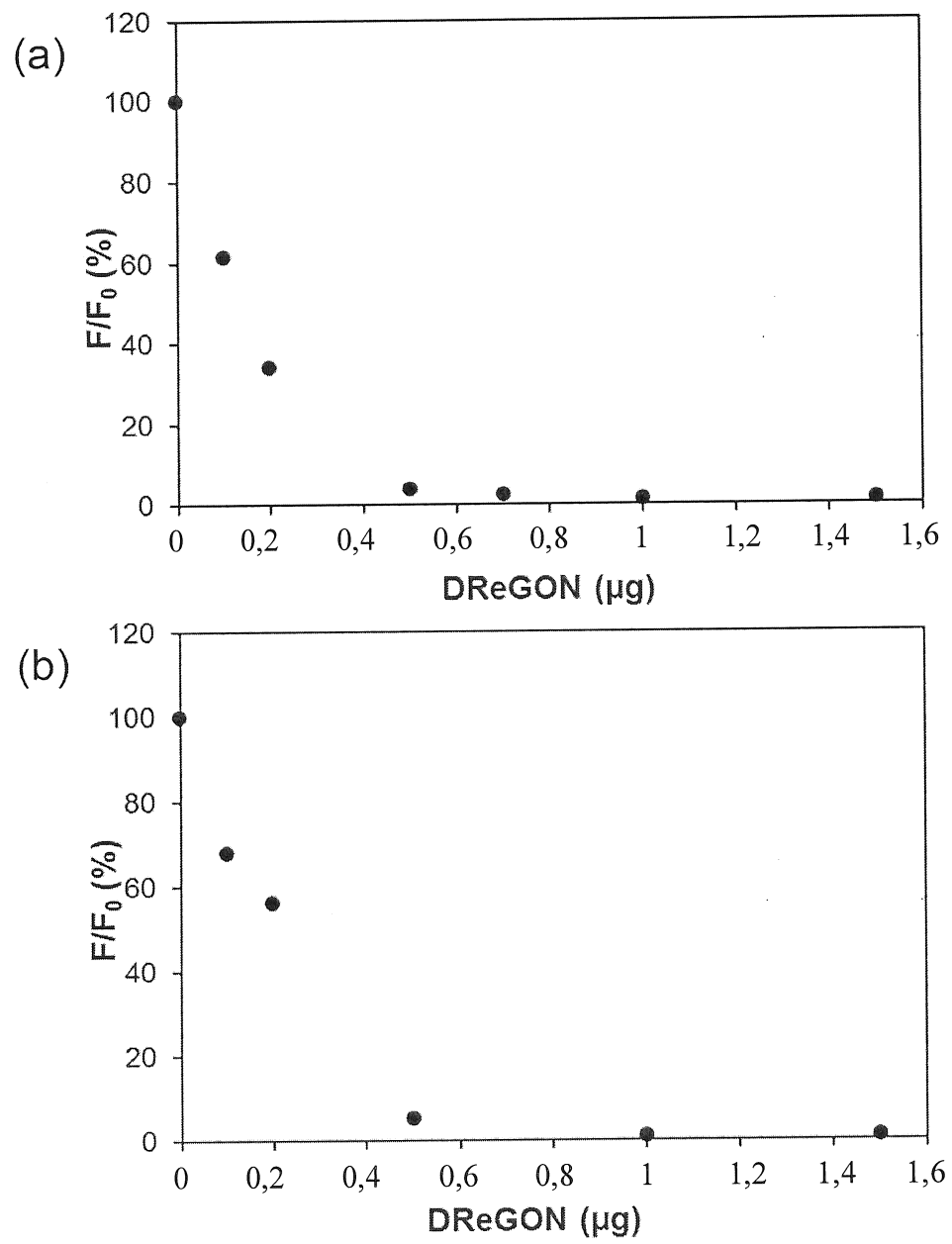
[FIG. 5]



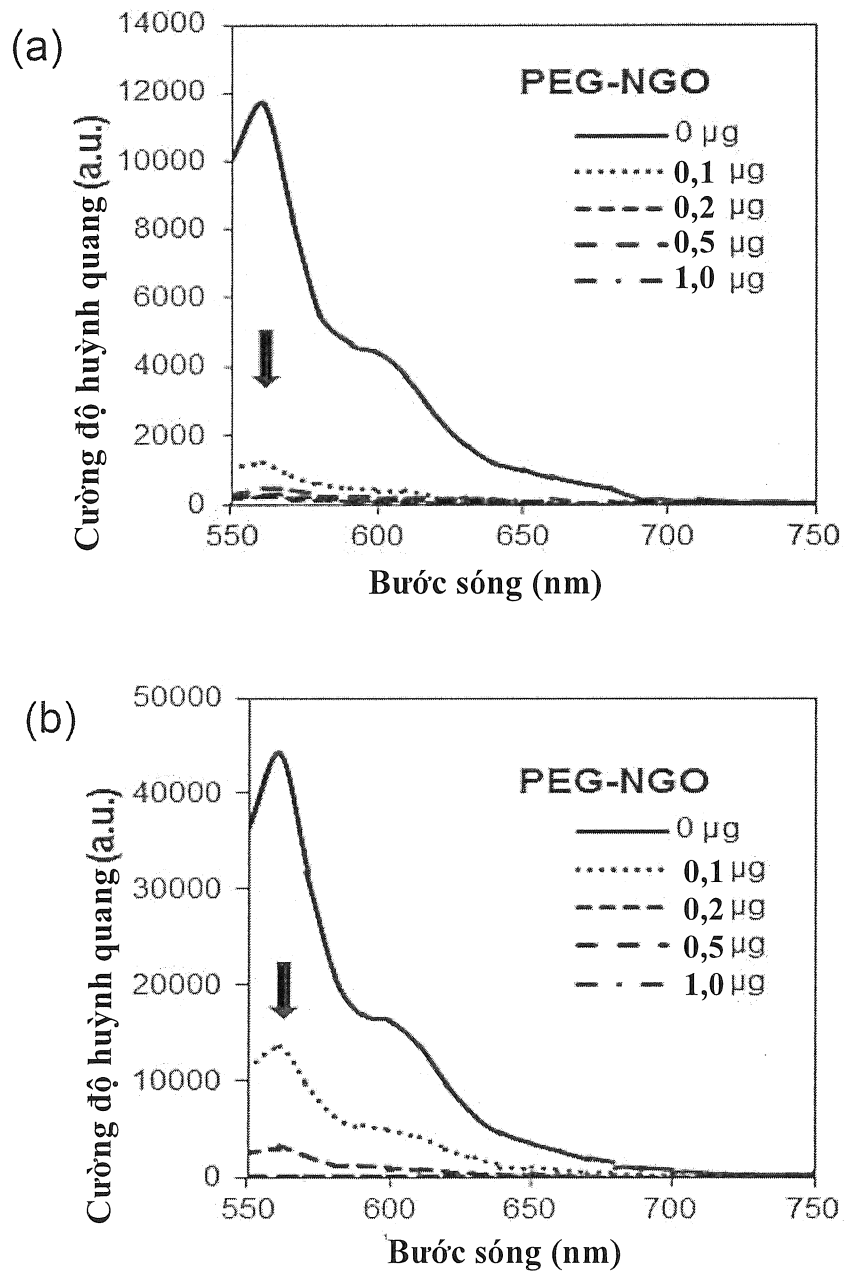
[FIG. 6]



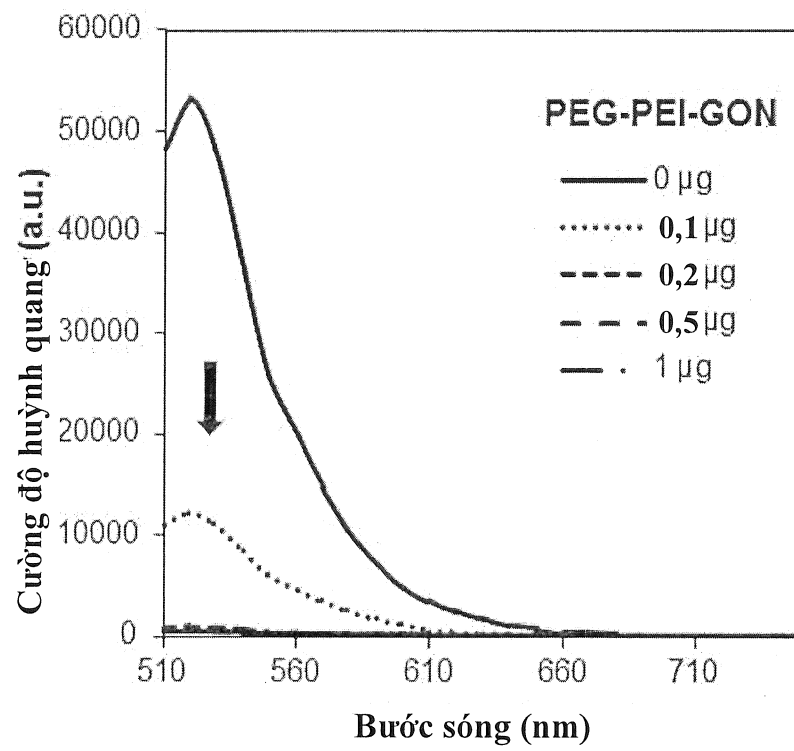
[FIG. 7]



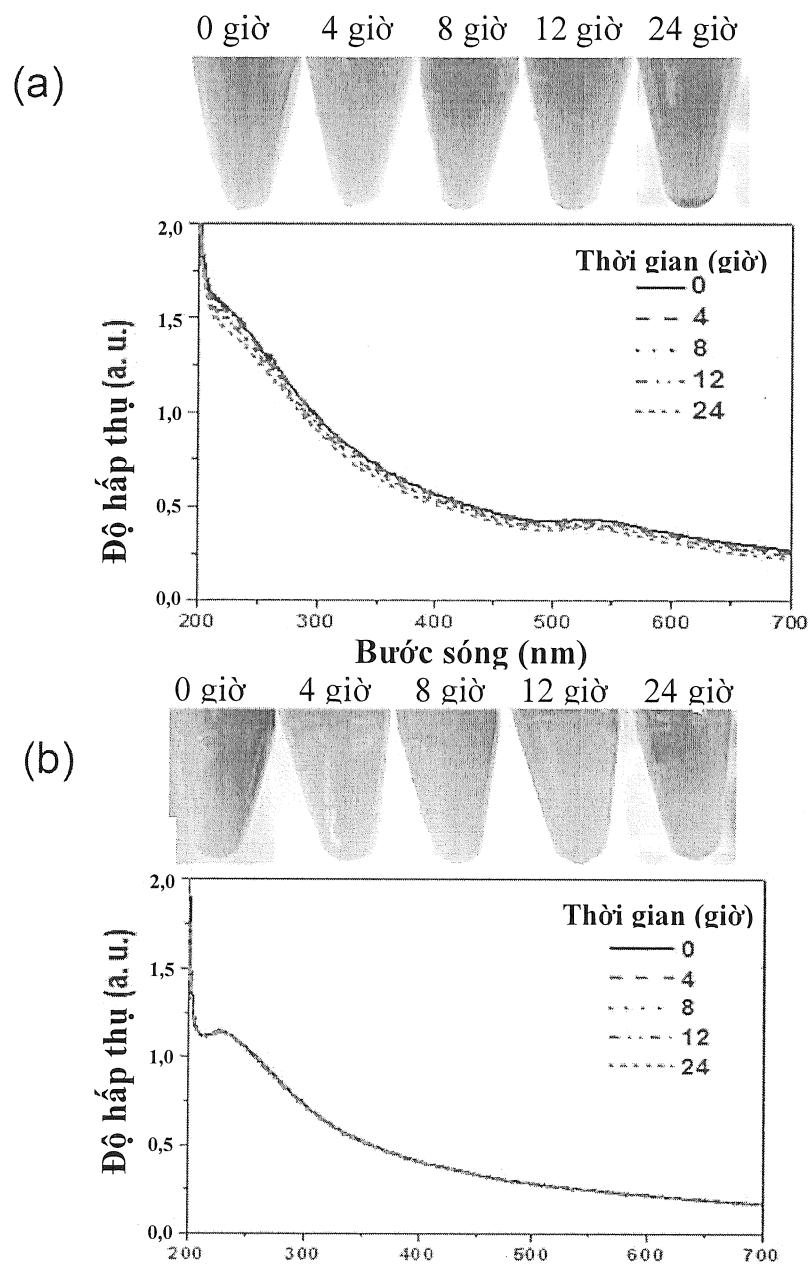
[FIG. 8]



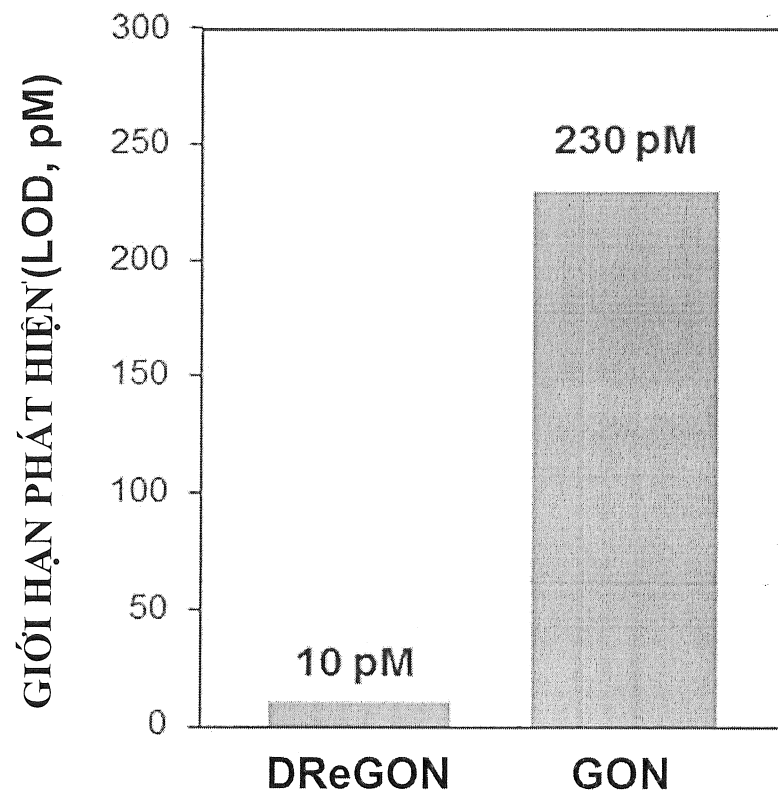
[FIG. 9]



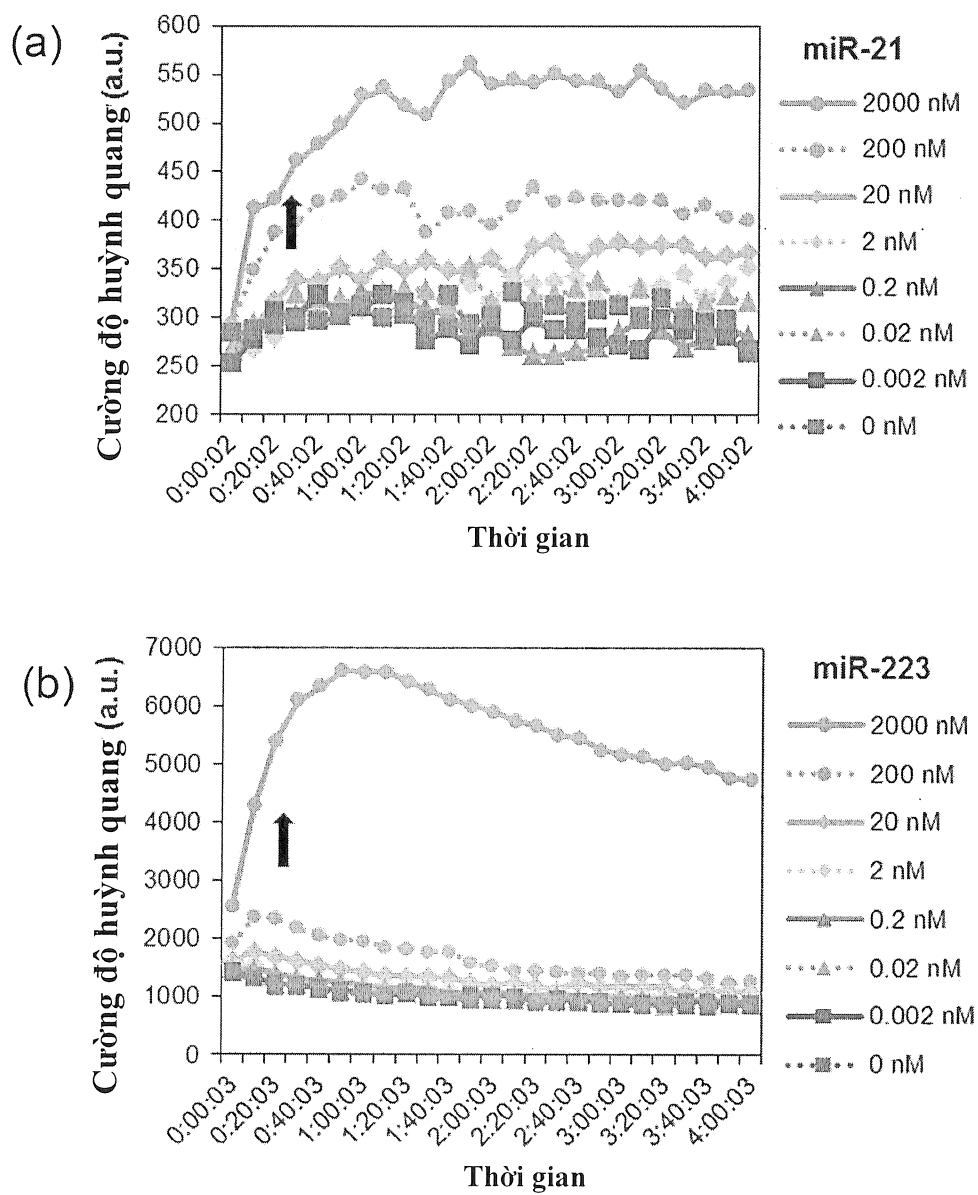
[FIG. 10]



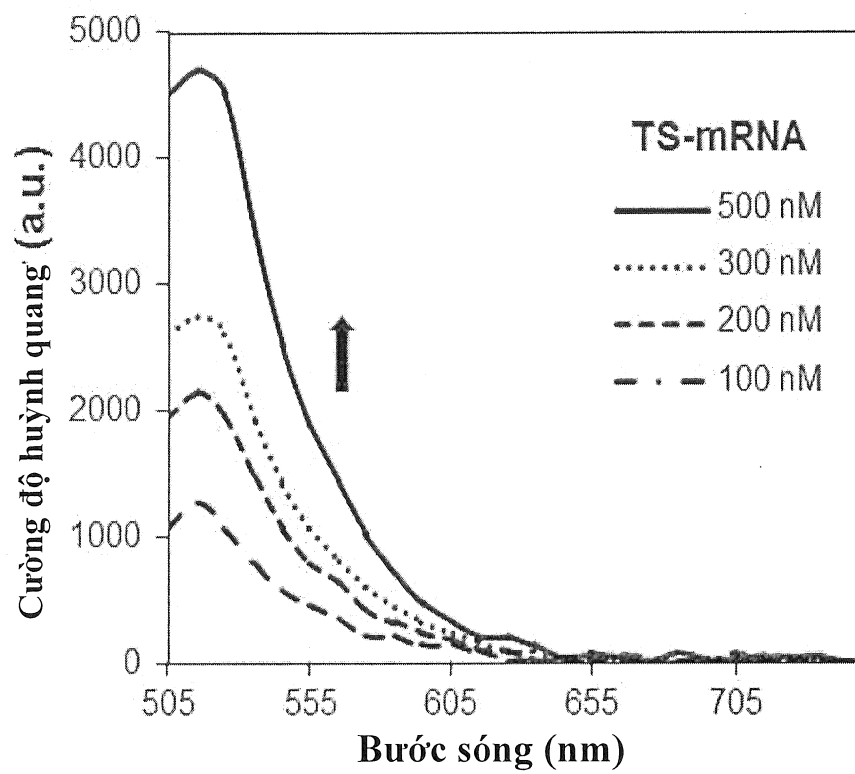
[FIG. 11]



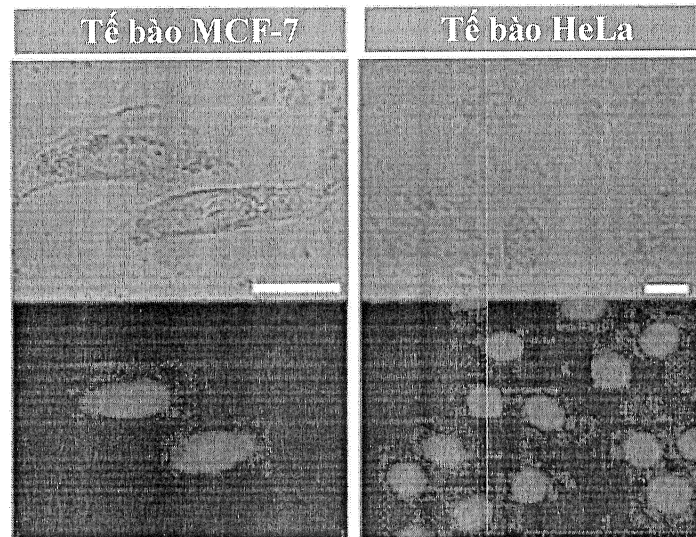
[FIG. 12]



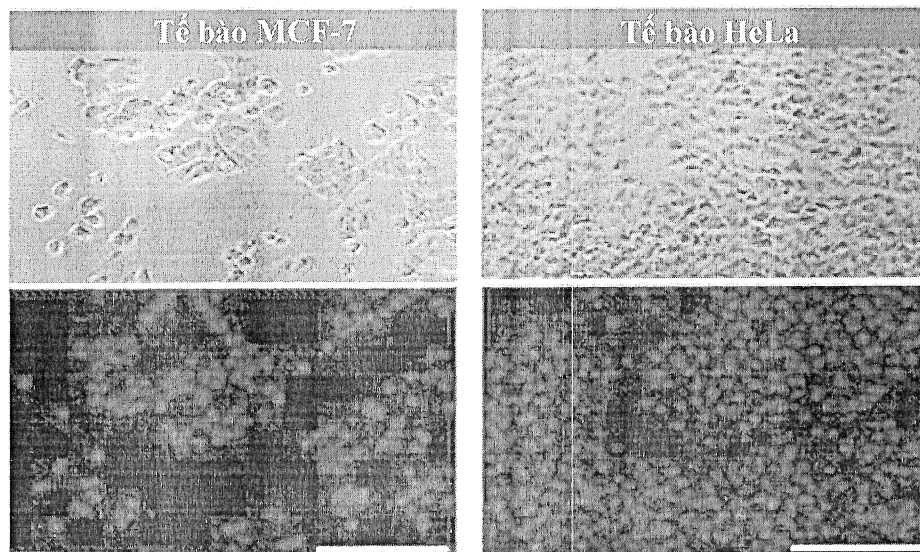
[FIG. 13]



[FIG. 14]

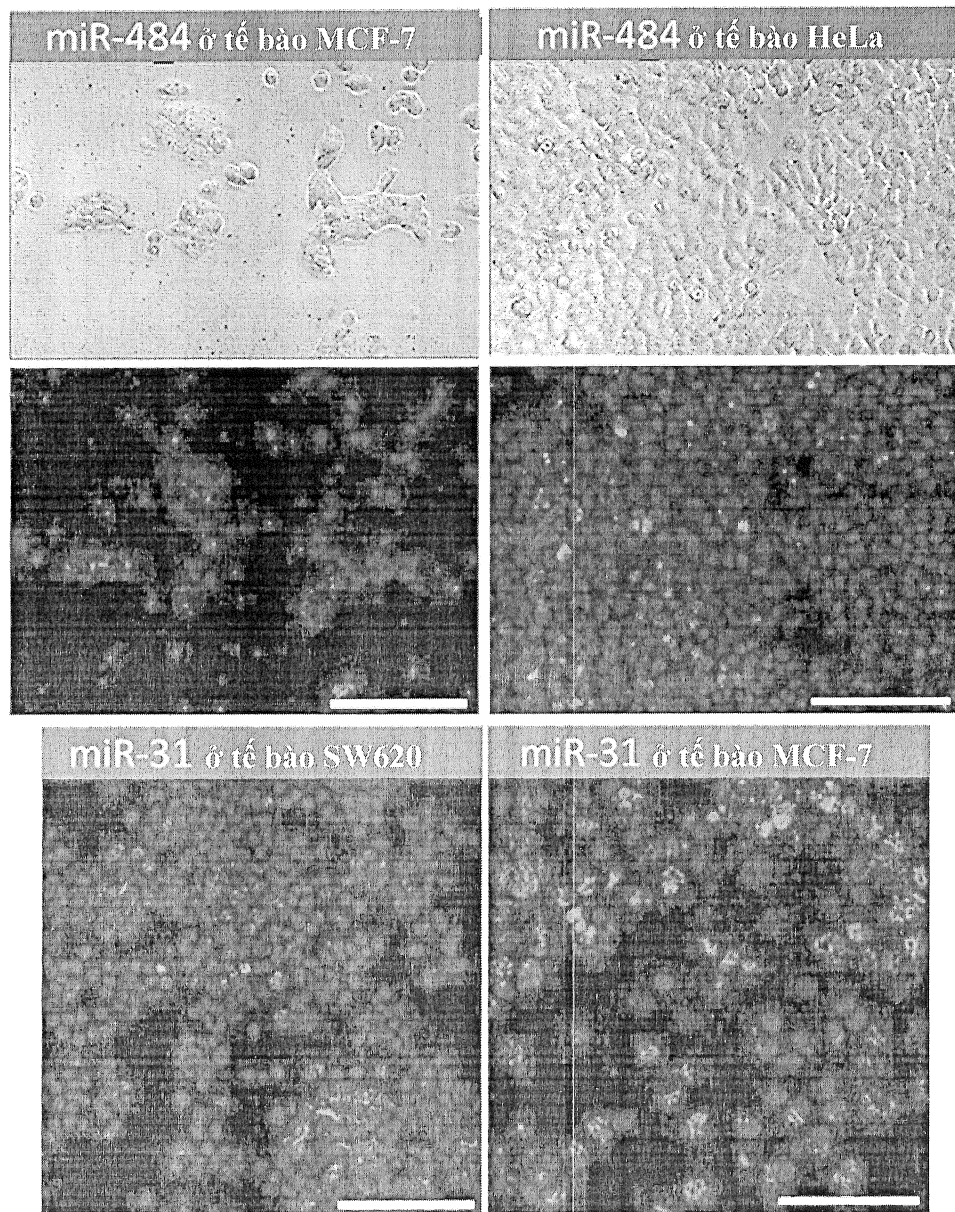


Khung tỉ lệ là 20 μm .

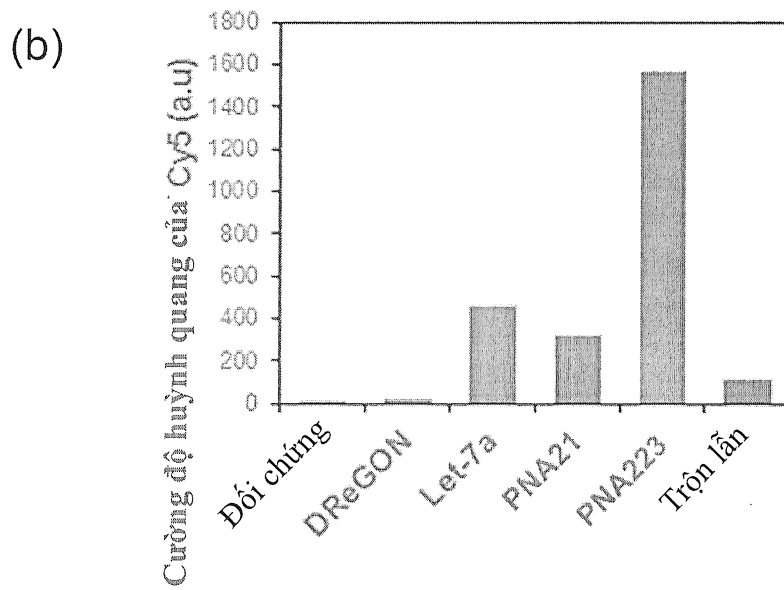
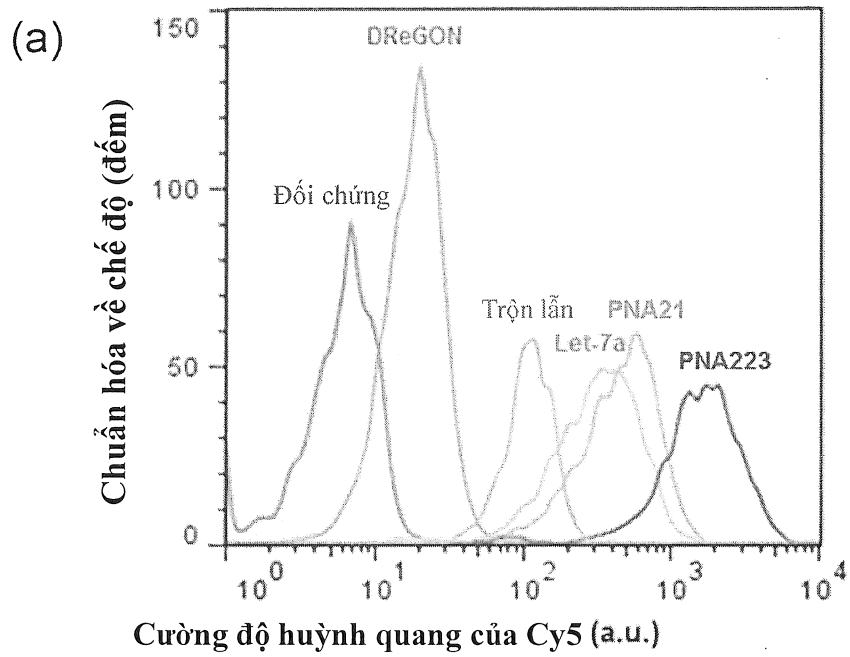


Khung tỉ lệ là 100 μm .

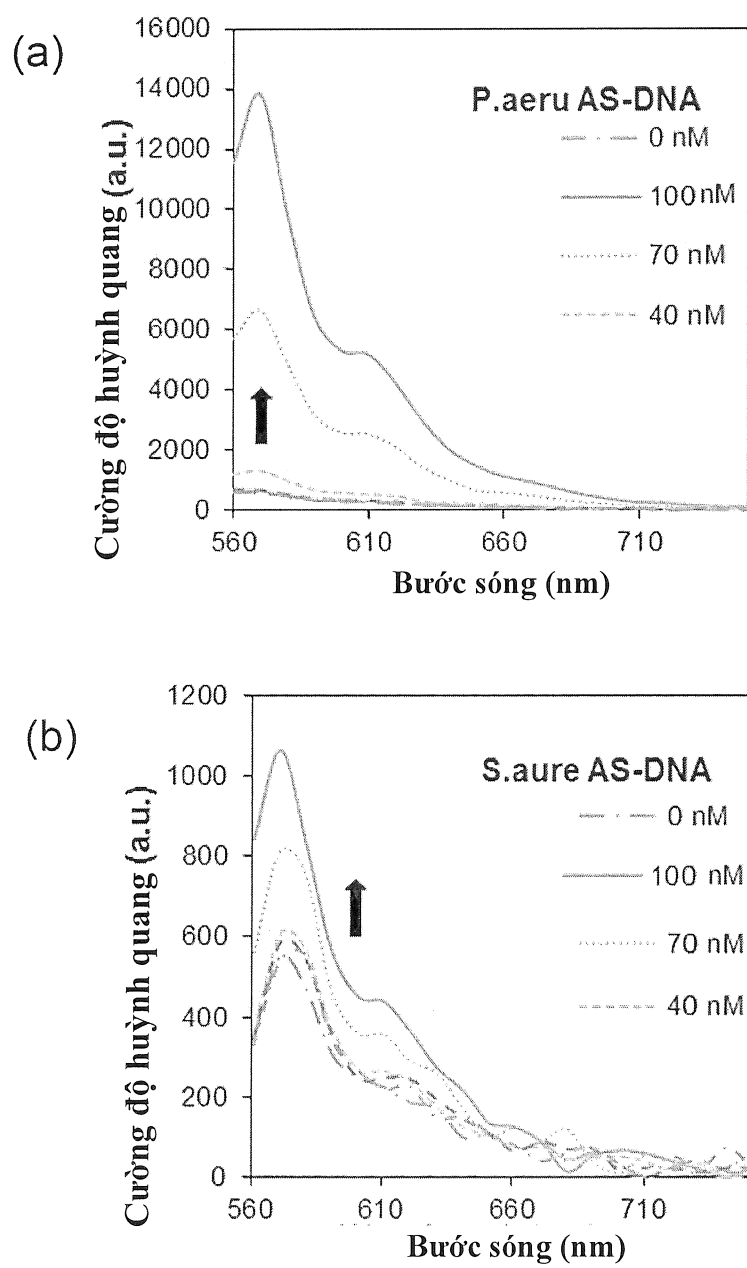
[FIG. 15]



[FIG. 16]



[FIG. 17]



[FIG. 18]

