



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

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

(11)



2-0003000

(51) **C12Q 1/68**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00482

(22) 02/10/2020

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/12/2020 393

(76) 1. Trịnh Thế Sơn (VN)

Số 28, Liên Kề 3, Khu Đô Thị Xa La, phường Phúc La, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

2. Đặng Tiến Trường (VN)

Phòng 702, V3, Victoria Văn Phú, phường Phú La, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

3. Nguyễn Thanh Tùng (VN)

Số 29, Liên kề 1, Khu đô thị An Hưng, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

4. Quán Hoàng Lâm (VN)

Số 14/BT2, Khu đô thị Xa La, phường Phúc La, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

5. Hoàng Văn Ái (VN)

160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

6. Nguyễn Thục Anh (VN)

P2406 chung cư Rainbow, Văn Quán, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(54) **QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI VÀ THU HỒI ADN TỪ PHÔI ĐỂ SÀNG LỌC DI
TRUYỀN KHÔNG XÂM LẤN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn bao gồm các bước: thu nhận noãn, tạo phôi trong ống nghiệm, nuôi cấy phôi đơn giọt, đục lỗ phôi cấy, thu hồi ADN tự do của phôi cho phép loại bỏ được ADN của bố, mẹ và hạn chế ADN tạp nhiễm để có thể thu được ADN của phôi ngay ở giai đoạn phôi nang mà không cần sinh thiết, can thiệp xâm lấn phôi. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép sàng lọc di truyền phôi thụ tinh trong ống nghiệm ở giai đoạn sớm một cách chính xác và hiệu quả, phản ánh đúng đặc điểm di truyền phôi phục vụ sàng lọc di truyền phôi không xâm lấn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực y sinh và di truyền học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn ở giai đoạn sớm phôi thụ tinh trong ống nghiệm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện tình trạng vô sinh chiếm khoảng từ 8 đến 12% các cặp vợ chồng ở độ tuổi sinh sản. Theo Mascarenhas 2012, vào năm 2010 ước tính khoảng 48,5 triệu cặp vợ chồng vô sinh và đang có xu hướng tăng dần. Có nhiều phương pháp điều trị vô sinh hiếm muộn, trong đó thụ tinh trong ống nghiệm là một phương pháp quan trọng trong điều trị vô sinh hiếm muộn hiện nay. Tỷ lệ thành công của thụ tinh trong ống nghiệm hiện nay vào khoảng từ 30 đến 45%. Để cải thiện tỷ lệ thành công trong thụ tinh ống nghiệm, xét nghiệm di truyền tiền làm tổ là một kỹ thuật sàng lọc giai đoạn sớm để đảm bảo sàng lọc, loại trừ những phôi bất thường về mặt di truyền trước khi cấy vào buồng tử cung người mẹ. Kỹ thuật sàng lọc sớm này đảm bảo chỉ có những phôi tốt, không bất thường, khiếm khuyết về di truyền được phát triển thành thai, nhằm hạn chế những tai biến không mong muốn như đa thai, thai lưu, sinh non hoặc các dị tật di truyền không mong muốn khác.

Hiện các kỹ thuật xét nghiệm di truyền sớm phôi, hay còn gọi là xét nghiệm tiền làm tổ, thường được sử dụng như: PGT-A để sàng lọc lệch bội nhiễm sắc thể, PGT-M để chẩn đoán bệnh lý đơn gen, PGT-SR để sàng lọc rối loạn cấu trúc NST. PGT-A để sàng lọc rối loạn bất thường về lệch bội nhiễm sắc thể, ở giai đoạn trước khi chuyển phôi vào tử cung của người mẹ. PGT-A nhằm tìm ra những phôi chuẩn bội, loại bỏ các phôi có bất thường nhiễm sắc thể như thể tam bội (trisomy) hoặc thể đơn bội (monosomy). Việc chuyển những phôi chuẩn bội làm tăng tỷ lệ thành công trong thụ tinh trong ống nghiệm và giảm các bất thường về mặt di truyền, đảm bảo được những đứa trẻ sinh ra khỏe mạnh cả về thể chất và di truyền.

Tuy nhiên, để thực hiện các xét nghiệm này hiện buộc phải sinh thiết phôi. Việc sinh thiết phôi là một xét nghiệm xâm lấn, nghĩa là cần cắt một vài tế bào trên phôi để xét nghiệm di truyền. Mặc dù hiện nay việc sinh thiết được thực hiện vào giai đoạn

phôi nang để giảm thiểu tác động đến phôi, nhưng vẫn có những lo ngại liên quan đến khả năng sống của phôi. Ngoài ra, việc sinh thiết chỉ có thể thực hiện từ 4 đến 5 tế bào lá nuôi (trophectoderm - TE), sẽ không có tính đại diện cho toàn bộ phôi trong trường hợp phôi khảm, có thể dẫn tới tình trạng chẩn đoán dương tính giả và âm tính giả.

Chính vì vậy, đã có một số nghiên cứu nhằm kiểm tra di truyền của phôi mà không cần phải thực hiện sinh thiết xâm lấn. Một số phương pháp hiện nay bao gồm, chẩn đoán ADN tự do trong dịch xoang phôi túi, hoặc trong môi trường nuôi cấy. Việc khuếch đại thành công nguồn vật chất di truyền này, qua đó khảo sát rối loạn nhiễm sắc thể của phôi đã đặt nền tảng cho chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi không xâm lấn (Noninvasive PGT-A/NiPGT-A). NiPGT-A được tập trung nghiên cứu và hứa hẹn khắc phục được các nhược điểm của PGT-A, bên cạnh đó tính chính xác, đơn giản trong quy trình cũng như hiệu quả kinh tế được nâng cao đáng kể.

Đối với phôi thụ tinh trong ống nghiệm, sau khi thụ tinh, hợp tử bắt đầu quá trình phân chia, tạo thành các tế bào nhỏ gọi là phôi bào, các phôi bào này tiếp tục phân cắt thành các phôi bào nhỏ hơn và tiếp tục phân chia mà không có sự tăng trưởng về kích thước đến giai đoạn 8 phôi bào thì xuất hiện hiện tượng nén phôi bào để tăng tiếp xúc giữa các phôi bào tạo nên các kênh liên kết giữa các phôi bào với nhau và phân chia đến giai đoạn 16 phôi bào (giai đoạn phôi dâu. Bên trong khối phôi bào xuất hiện khoang chứa đầy dịch (blastocoele) và nở ra nhanh chóng để phát triển sang giai đoạn phôi nang (blastocyst). Phôi nang trải qua 6 giai đoạn là phôi nang sớm, khoang dịch chiếm dưới 1/2 thể tích phôi, giai đoạn phôi nang, khoang dịch chiếm trên 1/2 tổng thể tích của phôi, giai đoạn phôi nang đầy, khoang dịch chiếm hầu hết thể tích của phôi, giai đoạn phôi nang rộng, khoang dịch phát triển rộng làm cho lớp màng trong suốt bao quanh phôi bắt đầu mỏng dần, giai đoạn phôi nang đang thoát màng, nguyên bào lá nuôi bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt và giai đoạn phôi nang đã thoát màng, khi phôi nang đã hoàn toàn thoát ra khỏi màng trong suốt. Quá trình này phôi đã đạt được khoảng 6 ngày tuổi.

Tuy nhiên, các kỹ thuật hiện nay khó thực hiện ở giai đoạn sớm, nghĩa là giai đoạn phôi nang khi phôi ở độ tuổi từ 3 đến 5 ngày tuổi. Các kỹ thuật xét nghiệm di truyền không xâm lấn này bị giới hạn bởi tạp nhiễm ADN của người cho, nghĩa là bị tạp nhiễm bởi ADN của các tế bào nang bao quanh noãn từ người cho.

Trong tất cả các kỹ thuật xét nghiệm di truyền, yếu tố tiên quyết là phải thu được ADN của phôi, nhưng không bị tạp nhiễm bởi ADN từ bên ngoài cũng như từ người cho. Ngoài ra, với phôi giai đoạn đầu, số lượng tế bào rất ít nên ngoài việc tránh tác động trực tiếp đến phôi, một hạn chế lớn đó là lượng mẫu ADN thu được phải đủ ở ngưỡng để có thể sử dụng được trong các phân tích di truyền.

Do đó, cần có quy trình có khả năng thu ADN từ phôi nuôi cấy thụ tinh trong ống nghiệm ở giai đoạn sớm, khoảng 5 ngày tuổi, trước khi phôi thoát màng để có thể sử dụng trong xét nghiệm di truyền sàng lọc phôi giai đoạn tiền làm tổ, để sàng lọc phôi giai đoạn ống nghiệm, phục vụ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ không xâm lấn.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn. Quy trình theo giải pháp hữu ích có thể thu hồi ADN sạch từ phôi ở giai đoạn đầu trong ống nghiệm mà không tác động đến phôi cũng như loại bỏ được ADN của mẹ tạp nhiễm hoặc các phôi khảm.

Quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) thu nhận noãn bằng cách tách cụm phức hợp noãn/tế bào nang từ mẫu sinh thiết tế bào buồng trứng và chuyển lên đĩa nuôi cấy chứa dung dịch thu nhận noãn và phôi bổ sung albumin huyết thanh của người ở pH=7,3 để tách phức hợp noãn, phức hợp này được rửa 5 lần bằng dung dịch nhận noãn và phôi này, sau đó chuyển phức hợp này vào môi trường nuôi phôi chứa albumin huyết thanh người và gentamixin và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ rồi tách lớp tế bào nang xung quanh noãn bằng cách rửa trong môi trường tách noãn chứa enzym hyaluronidaza trong khoảng từ 5 đến 50 giây, sau đó noãn không chứa tế bào nang được chuyển sang môi trường nuôi cấy noãn;

b) tạo phôi trong ống nghiệm bằng cách cố định noãn vào đĩa cấy noãn sao cho thể cực được giữ với góc nghiêng từ 0 đến 15° theo chiều thẳng đứng và tiêm tinh trùng vào màng bào tương noãn theo chiều vuông góc với thể cực bằng vi kim đến vùng bào tương ở vị trí khoảng từ 1/2 đến 1/3 đường kính bào tương noãn và phá vỡ

màng bào tương, sau khi tiêm, noãn được nuôi trong môi trường nuôi cấy khoảng 18 đến 19 giờ, thu nhận được phôi giai đoạn tiền nhân phát triển bình thường;

c) nuôi cấy phôi đơn giọt bằng cách lựa chọn từng phôi giai đoạn tiền nhân và chuyển sang đĩa nuôi cấy đơn chứa 30 μ l môi trường nuôi cấy phôi, tiến hành nuôi ở 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ đến ngày thứ ba, tiếp đó từng phôi được rửa tuần tự qua 4 giọt môi trường nuôi cấy đã được cân bằng ở 37°C, 6% CO₂ và phủ dầu parafin 3mm trước 1 ngày và chuyển vào môi trường nuôi cấy đơn giọt chứa 15 μ l môi trường nuôi cấy;

d) đục lỗ phôi nuôi cấy bằng cách chiếu tia laze ở bước sóng 650nm, độ rộng xung 0,012ms, kích thước 8 μ m để tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi với kích thước 8 μ m và tiếp tục nuôi cấy phôi trong môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ trong 2 ngày để phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang thu dịch nuôi cấy; và

e) thu hồi ADN tự do của phôi bằng cách chuyển dịch nuôi cấy vào ống ly tâm thu được mẫu chứa ADN tự do của phôi,

trong đó, quy trình này không nhằm mục đích điều trị.

Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước khử ADN tạp nhiễm trên dụng cụ và thiết bị nuôi cấy bằng cách vệ sinh bằng dung dịch NaClO₂ 2% và chiếu tia cực tím với bước sóng 253,7 nm cường độ 54W trong thời gian 30 phút để phá hủy ADN tạp nhiễm trước khi thao tác mẫu.

Quy trình theo điểm 1, trong đó bước đục lỗ phôi được thực hiện bằng cách cố định phôi và chiếu tia laze trong khoảng thời gian sao cho đủ để tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi nhưng không tác động đến phôi bên trong lớp màng.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh kết quả điện di sản phẩm khuếch đại ADN từ mẫu sinh thiết tế bào phôi (TE) và ADN từ mẫu dịch nuôi cấy phôi (SCM). Kết quả cho thấy hình ảnh băng ADN được khuếch đại thành công từ mẫu dịch nuôi cấy và mẫu tế bào sinh thiết.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các quy trình thực hiện cụ thể, tuy nhiên các quy trình này chỉ nhằm mục đích minh họa nhằm làm rõ bản chất của

giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, các kỹ thuật nuôi và môi trường nuôi cấy phôi trong ống nghiệm được thực hiện bởi kỹ thuật nuôi và môi trường chuẩn. Phôi theo giải pháp hữu ích là phôi bất kỳ được tạo ra bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm và có thể là phôi được tạo ra từ tế bào noãn và tinh trùng của động vật bất kỳ cần sàng lọc di truyền.

Theo giải pháp hữu ích, các môi trường nuôi phôi, môi trường thu nhận noãn, môi trường nuôi cấy chứa hoặc không chứa albumin huyết thanh người là các môi trường nuôi cấy chuẩn được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể pha chế theo các sổ tay hướng dẫn, hoặc có thể được cung cấp bởi các nhà cung cấp với hướng dẫn kèm theo, ví dụ, các môi trường thu nhận noãn như môi trường GMOPS (Vitrolife, Thụy Điển), môi trường nuôi phôi G-IVF (Vitrolife, Thụy Điển), môi trường nuôi phôi bổ sung albumin huyết thanh người như G-IVF Plus (Vitrolife, Thụy Điển) hay môi trường tách noãn chứa enzym hyaluroendaza Hyas (Vitrolife, Thụy Điển).

Theo giải pháp hữu ích, phôi cần thu ADN là phôi ở giai đoạn sớm, nghĩa là là phôi ở giai đoạn phôi bào (3 ngày tuổi) đến giai đoạn phôi nang (5 ngày tuổi). Giai đoạn này, phôi mới được hình thành và cần tránh sinh thiết phôi, thao tác phôi làm giảm sức sống của phôi.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu nhận noãn; b) tạo phôi trong ống nghiệm; c) nuôi cấy phôi đơn giọt; d) đục lỗ phôi nuôi cấy; và e) thu hồi ADN tự do của phôi.

Các thiết bị và hóa chất sử dụng cho quy trình theo giải pháp hữu ích cần vô trùng tuyệt đối và được khử ADN tạp nhiễm từ người thao tác cũng như từ môi trường. Đây là bước phụ trợ, nhưng là một yếu tố đảm bảo đến hiệu quả thu ADN phôi bằng quy trình theo giải pháp hữu ích. Để đảm bảo ADN thu được chỉ có nguồn gốc từ phôi, các dụng cụ và thiết bị nuôi cấy, ví dụ buồng thao tác, kính hiển vi soi nổi, kính hiển vi đảo ngược, đĩa petri, hộp nuôi cấy Nunc 4 giếng, bơm tiêm, pipet, đầu côn, v.v. đều được khử ADN tạp nhiễm bằng cách vệ sinh bằng dung dịch NaClO_2 2% và chiếu tia

cực tím với bước sóng 253,7 nm cường độ 54W trong thời gian 30 phút trước khi thao tác mẫu.

Thiết bị chiếu tia cực tím UV-C nhằm mục đích phá vỡ các cấu trúc ADN ở môi trường, ngăn tạp nhiễm. Thời gian chiếu tia UV-C khử trùng và phân hủy ADN trong thiết bị nuôi cấy vô trùng được thực hiện trong thời gian 30 phút, và quá trình thao tác trên mẫu cần được tiến hành trong khoảng thời gian không quá 2 giờ kể từ khi xử lý bằng tia UV-C.

Để khử nhiễm ADN bề mặt các thiết bị, tiến hành lau chùi bề mặt buồng thao tác cũng như các thiết bị thao tác bằng dung dịch NaClO 2% trước khi thao tác mẫu.

Trong bước thu nhận noãn, mẫu phức hợp noãn/tế bào nang được sử dụng để thu nhận noãn là cụm phức hợp noãn/tế bào nang thu được từ mẫu sinh thiết tế bào buồng trứng. Mẫu tế bào buồng trứng này có thể thu được bằng chọc hút nang buồng trứng và chuyển lên đĩa nuôi cấy để tách phức hợp noãn. Các thao tác thực hiện trong bước này được tiến hành dưới kính hiển vi soi nổi để tách noãn trong phức hợp noãn-tế bào nang. Noãn được hút bằng micropipet rồi chuyển sang đĩa rửa noãn. Dung dịch thu nhận noãn là dung dịch đệm pH để giữ pH môi trường ở pH=7,3 chứa albumin huyết thanh của người, ví dụ, có thể sử dụng dung dịch GMOPS (Vitrolife, Thụy Điển) để thu nhận và tách rửa tế bào nang.

Sau khi tách, phức hợp noãn-tế bào nang được rửa lại 5 lần bằng dung dịch thu nhận noãn nhằm loại bỏ tế bào nang. Quá trình rửa này được thực hiện bằng cách hút, nhả bằng micropipet và được thực hiện trong giếng rửa noãn của hộp cấy noãn. Sau đó chuyển phức hợp này vào môi trường nuôi phôi chứa albumin huyết thanh người và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂. Theo một phương án cụ thể, môi trường nuôi phôi được sử dụng là môi trường G-IVF Plus (Vitrolife, Thụy Điển), là môi trường nuôi cấy G-IVF bổ sung albumin huyết thanh người và gentamixin.

Để tách lớp tế bào nang bao quanh noãn, tiến hành rửa noãn trong môi trường tách noãn chứa enzym hyaluronidase trong khoảng từ 5 đến 50 giây. Cụ thể, noãn được rửa bằng dung dịch Hyas (Vitrolife, Thụy Điển) trong khoảng thời gian từ 5 đến 50 giây, tốt nhất là khoảng 20 giây. Quá trình rửa này không được phép kéo dài quá 1 phút vì enzym sau khi loại bỏ lớp tế bào nang, có thể phá vỡ màng noãn, ảnh hưởng trực tiếp đến noãn. Quá trình tách tế bào nang bao quanh noãn này được thực hiện

bằng cách hút xả bởi micropipet để giúp tế bào nang bao quanh được loại bỏ hoàn toàn ra khỏi tế bào noãn.

Sau khi tách, tốt nhất noãn được rửa lại bằng môi trường nuôi cấy không chứa albumin huyết thanh người để loại bỏ hoàn toàn enzym cũng như loại bỏ tế bào nang bao quanh noãn, quá trình này nhằm loại bỏ ADN tạp nhiễm từ mẹ. Môi trường được sử dụng để rửa noãn này tốt nhất là môi trường G-IVF (Vitrolife, Thụy Điển).

Việc sử dụng enzym hyaluronidaza nhằm rã phức hợp tế bào nang bên ngoài noãn nhằm đảm bảo rằng thu được noãn không có tế bào nang. Việc này nhằm hạn chế tối đa ADN của mẹ tạp nhiễm trong quá trình tạo và nuôi phôi. Quá trình thao tác noãn và phôi được rửa và chuyển qua tuần tự nhiều lần môi trường, tốt nhất là 4 lần, nhằm đảm bảo loại bỏ tạp nhiễm DNA từ mẹ.

Trong bước tạo phôi trong ống nghiệm, sau khi thu được noãn sạch, tiến hành cố định noãn vào đĩa cấy. Cụ thể, noãn được hút và cố định bằng kim giữ, chỉnh vị trí noãn sao cho mặt dưới của noãn sẽ gần chạm vào đáy đĩa ICSI nhằm giúp noãn vững hơn quá trình thao tác. Các thao tác chuẩn được thực hiện dưới kính hiển vi có thể được thực hiện bởi các kỹ thuật viên theo hướng dẫn của nhà cung cấp thiết bị vi tiêm.

Việc cố định noãn vào đĩa cấy noãn được thực hiện sao cho thể cực được giữ với góc nghiêng từ 0 đến 15° theo chiều thẳng đứng. Tiếp đó tinh trùng được tiêm vào màng bào tương noãn theo chiều vuông góc với thể cực bằng vi kim kích thước 5µm. Chiều sâu kim tiêm được đưa đến vùng bào tương ở vị trí khoảng từ 1/2 đến 1/3 đường kính bào tương noãn. Sau khi kim tiêm đã nằm trong màng bào tương, cần đảm bảo cho màng bào tương đã vỡ trước khi tiêm tinh trùng.

Sau khi tiêm tinh trùng, từng noãn được ủ trong môi trường nuôi cấy đến khoảng từ 18 đến 19 giờ để kiểm tra sự hình thành phôi. Cụ thể là lựa chọn những tế bào có tính chất đối xứng, có sự hiện diện của tế bào tiền nhân, có vị trí của thể cực là những tế bào noãn được thụ tinh thành công tạo phôi. Những tế bào noãn không phát triển thành phôi được loại bỏ.

Tiếp đó, các phôi được tiến hành nuôi cấy đơn giọt. Quá trình này đảm bảo tế bào phôi được tách rời, đảm bảo không có sự trộn lẫn, pha tạp ADN giữa các phôi với nhau, từ đó có thể kiểm soát được ADN thu được của từng phôi.

Quá trình nuôi cấy đơn giọt được thực hiện khi phôi được 3 ngày tuổi. Trước khi nuôi cấy đơn giọt, phôi sau khi được lựa chọn ở giai đoạn tiền nhân (18-19 giờ sau khi thụ tinh) được chuyển sang đĩa nuôi cấy đơn chứa 30 μ l môi trường nuôi cấy phôi. Tiến hành nuôi ở 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ đến ngày thứ ba (phôi được 3 ngày tuổi).

Môi trường rửa và môi trường nuôi cấy đơn giọt được chuẩn bị bằng cách ủ và cân bằng ở 37°C, 6% CO₂ và phủ dầu parafin 3mm trước 1 ngày. Tiếp đó rửa từng phôi tuần tự qua 4 giọt môi trường nuôi rửa đã và chuyển vào môi trường nuôi cấy đơn giọt chứa 15 μ l môi trường nuôi cấy. Quá trình này tránh làm sốc tế bào phôi, đồng thời loại bỏ ADN tạp của tế bào nang, nếu còn, có trong môi trường nuôi cấy để đảm bảo chỉ thu được ADN của phôi ở giai đoạn sau.

Mỗi giọt môi trường nuôi cấy (15 μ l) được sử dụng để nuôi cấy một phôi. Bằng thực nghiệm các tác giả đã nhận thấy rằng, với lượng môi trường lớn hơn 15 μ l, lượng ADN thu được sẽ rất khó khăn vì phải trải qua quá trình tách loại môi trường, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng khuếch đại ADN bằng kỹ thuật PCR về sau, ngược lại, nếu lượng môi trường nuôi cấy ít hơn 15 μ l, khi đó tế bào không đủ dưỡng chất để sinh trưởng và phát triển, đồng thời lượng mẫu thu được ít, khó thực hiện được các phản ứng PCR về sau. Do đó, để cân bằng giữa hiệu suất, thời gian nuôi và khả năng thu được ADN đủ để làm mẫu cho phản ứng PCR, việc nuôi cấy phôi đơn giọt cho phép thu được lượng ADN phôi với mật độ lớn nhất, đủ để thực hiện phản ứng PCR.

Để thu được ADN phôi, tiến hành đục lỗ phôi nuôi cấy bằng tia laze. Đây là bước quan trọng nhất quyết định đến khả năng thu hồi ADN của phôi. Theo đó, mỗi phôi được cố định và chiếu tia laze ở bước sóng 650nm, độ rộng xung 0,012ms, kích thước 8 μ m để tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi với kích thước 8 μ m. Quá trình này được thực hiện trên thiết bị vi thao tác và được thực hiện với phôi 3 ngày tuổi. Các tác giả bằng thực nghiệm thấy rằng, với phôi 3 ngày tuổi, phần phôi chưa phủ đầy màng ngoài của phôi. Khi đó chiếu tia laze để đục lỗ trên màng trong suốt của phôi ít có khả năng tác động đến phôi. Việc đục lỗ trên màng phôi này được thực hiện trên thiết bị vi thao tác và hoàn toàn có thể khống chế được thời gian chiếu tia laze, sao cho có thể thu được một lỗ trên màng ngoài với kích thước lỗ 8 μ m.

Ngoài ra, cường độ, bước sóng và độ rộng và kích thước của nguồn tia laze cũng được tối ưu. Nếu cường độ tia laze mạnh và/hoặc thời gian chiếu dài, tia laze sẽ tác

động trực tiếp đến phôi, gây chết phôi. Ngược lại, nếu cường độ tia laser không đủ, thời gian chiếu dài, ngoài việc khó tạo lỗ còn khiến tăng nhiệt độ gây chết phôi. Do đó, việc đục lỗ với kích thước, cường độ tia laser tối ưu là ở bước sóng 650nm, độ rộng xung 0,012ms, kích thước 8µm để tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi với kích thước 8µm, đủ để cho phép ADN khuếch tán ra ngoài môi trường nuôi cấy, nhưng không ảnh hưởng đến phôi.

Việc tạo lỗ trên màng ngoài của phôi vừa phải đảm bảo sao cho không ảnh hưởng tới phôi, nhưng vừa giúp ADN tự do trong phôi khuếch tán ra ngoài môi trường nuôi cấy qua phần màng phôi được đục lỗ giúp thu hồi được ADN tự do của phôi. Đây là một bước quyết định đến hiệu suất thành công của quy trình. Trường hợp chiếu tia laser với cường độ quá mạnh hoặc quá lâu, tia laser sẽ phá vỡ màng ngoài của phôi, gây chết phôi. Ngược lại, nếu chiếu tia laser với cường độ thấp hơn hoặc với thời gian ngắn hơn, quá trình đục màng phôi chưa hoàn thành, khi đó không thu được, hoặc thu được ADN phôi với nồng độ thấp, không đủ để thực hiện các phân tích di truyền về sau. Bằng thực nghiệm, các tác giả nhận thấy rằng, việc đục lỗ phôi bằng tia laser không tiếp xúc tốt nhất ở ngày thứ 3, khi đó phôi đang ở giai đoạn phôi nang, ít ảnh hưởng nhất đến quá trình phát triển phôi, và đủ thời gian để thu nhận ADN tự do trước khi cấy chuyển phôi vào cơ thể mẹ.

Sau khi đục lỗ trên phôi, phôi được tiếp tục nuôi cấy đơn giọt trong 2 ngày trong điều kiện nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ để phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang, đồng thời khuếch tán ADN trong phôi ra dịch nuôi cấy.

Sau khi nuôi cấy, phôi được cấy chuyển sang môi trường mới để chuẩn bị cho các bước cấy làm tổ. Phần dịch nuôi cấy (15µl) được thu hồi, đây là mẫu chứa ADN tự do có trong môi trường nuôi cấy có thể sử dụng trực tiếp trong phản ứng PCR để khuếch đại ADN của phôi nhằm thực hiện các quá trình tiếp theo. Lượng ADN tự do của phôi đạt khoảng 10-20 ng/ml, đủ khả năng sử dụng làm mẫu trong phân tích, sàng lọc di truyền sớm đối với phôi được thụ tinh trong ống nghiệm nhằm loại bỏ những phôi có dị tật di truyền.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Nuôi cấy phôi và thu nhận ADN từ phôi thụ tinh trong ống nghiệm

Để đánh giá khả năng thu nhận ADN từ phôi thụ tinh trong ống nghiệm, tiến hành thử nghiệm với mẫu phôi thụ tinh trong ống nghiệm bằng phương pháp theo quy trình theo giải pháp hữu ích và quy trình thu nhận ADN bằng phương pháp xâm lấn thông thường.

Trước khi thử nghiệm, các dụng cụ thao tác, buồng thao tác và thiết bị nuôi cấy được khử ADN tạp nhiễm bằng cách vệ sinh bằng dung dịch NaClO_2 2% và chiếu tia cực tím với bước sóng 253,7 nm cường độ 54W trong thời gian 30 phút.

Môi trường thu nhận noãn và phôi, môi trường nuôi cấy, môi trường tách noãn được sử dụng là các môi trường chuẩn được cung cấp bởi Vitrolife (Thụy Điển) hoặc BioMed. Cụ thể môi trường thu nhận noãn và phôi (GMOPS), môi trường nuôi cấy (G-IVF), môi trường nuôi cấy bổ sung albumin huyết thanh người (G-IVF Plus), môi trường tách noãn chứa enzym hyaluronidaza (Hyas) được cung cấp bởi Vitrolife, Môi trường nuôi cấy LP được cung cấp bởi Biomed. Các điều kiện nuôi cấy được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Để chuẩn bị mẫu SCM, mẫu sinh thiết tế bào từ người cho được thu nhận và chuyển lên đĩa nuôi cấy chứa dung dịch thu nhận noãn và phôi bổ GMOPS ở pH=7,3 để tách phức hợp noãn trên kính hiển vi soi nổi. Phức hợp này được rửa 5 lần bằng dung dịch GMOPS sau đó chuyển phức hợp này vào môi trường nuôi phôi G-IVF Plus chứa albumin huyết thanh người và gentamixin. Tiến hành ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C , 6% CO_2 , 5% O_2 , sau đó tách lớp tế bào nang xung quanh noãn bằng cách hút rửa trong môi trường Hyas bằng pipet trong 10 giây. Mẫu noãn được rửa lại 4 lần bằng dung dịch G-IVF để rửa sạch enzym cũng như làm sạch tế bào nang bên ngoài noãn, sau đó chuyển noãn sang môi trường nuôi cấy noãn G-IVF.

Noãn được cố định trên đĩa cấy noãn bằng cách hút và cố định noãn bằng kim giữ trên thiết bị vi thao tác, chỉnh vị trí noãn sao cho mặt dưới của noãn gần chạm vào đáy đĩa nuôi cấy nhằm giúp noãn vững hơn trong quá trình thao tác.

Giữ noãn sao cho thể cực được giữ thẳng đứng, với góc nghiêng không quá 15° để dễ thao tác. Tiến hành tiêm tinh trùng vào màng bào tương noãn theo chiều vuông góc với thể cực bằng vi kim cỡ $5\mu\text{m}$. Giữ vị trí kim tiêm trong vùng bào tương ở vị trí khoảng từ 1/2 đến 1/3 đường kính bào tương noãn và phá vỡ màng bào tương. Sau khi

tiêm, noãn được nuôi trong môi trường nuôi cấy đến 19 giờ, quan sát, thu nhận những phôi giai đoạn tiền nhân phát triển bình thường.

Những phôi phát triển bình thường được chuyển sang đĩa nuôi cấy đơn chứa 30 μ l môi trường nuôi cấy phôi, tiến hành nuôi ở 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ đến ngày thứ ba. Tiếp đó từng phôi được rửa tuần tự qua 4 giọt môi trường nuôi cấy đã được cân bằng ở 37°C, 6% CO₂ và phủ dầu parafin 3mm trước 1 ngày và chuyển vào môi trường nuôi cấy đơn giọt chứa 15 μ l môi trường nuôi cấy.

Tiến hành chiếu tia laze ở bước sóng 650nm, độ rộng xung 0,012ms, kích thước 8 μ m trên thiết bị vi thao tác sau cho tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi với kích thước 8 μ m. Sau đó phôi được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ trong 2 ngày để phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang (5 ngày tuổi). Phần dịch nuôi cấy được hút và chuyển vào ống ly tâm thu được mẫu chứa ADN tự do của phôi (SCM).

Để đánh giá khả năng thu nhận ADN mẫu, tiến hành PCR giải trình tự toàn bộ hệ gen với các mẫu sau:

Mẫu ĐC: Thu nhận ADN bằng phương pháp nuôi cấy theo giải pháp hữu ích nhưng không đục lỗ phôi bằng tia laze.

Mẫu TE: Mẫu ADN được thu nhận bằng phương pháp sinh thiết thông thường.

Mẫu SCM: Mẫu ADN được thu nhận bằng phương pháp nêu trên.

Kết quả PCR trên Hình 1 cho thấy, với mẫu ĐC, không xuất hiện tín hiệu, điều này cho thấy hiệu quả loại bỏ ADN tạp nhiễm bằng kỹ thuật theo giải pháp hữu ích. Với mẫu TE và SCM, đều cho tín hiệu PCR là một băng sáng có thể nhận biết được. Điều này cho thấy bằng quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi bằng kỹ thuật theo giải pháp hữu ích cho phép thu được ADN đủ để thực hiện phản ứng PCR tương đương với lượng ADN thu nhận bằng phương pháp sinh thiết thông thường.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn theo giải pháp hữu ích cho phép thu được lượng ADN của phôi giai đoạn rất sớm, từ 3 đến 5 ngày tuổi, cho phép thực hiện các sàng lọc tiền làm tổ, tránh được những

nguy cơ phải phá bỏ phôi sau khi cấy. Quy trình cho phép tăng hiệu suất thu hồi ADN của phôi, cho phép sàng lọc di truyền sớm, kiểm tra chính xác đặc điểm di truyền phôi.

Quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn cho phép thu được ADN từ phôi có nồng độ đủ lớn (10-20ng/ul), có khả năng thực hiện phản ứng PCR, đáp ứng được yêu cầu về mẫu để thực hiện các xét nghiệm chẩn đoán di truyền tiền làm tổ không xâm lấn giai đoạn sớm, cho phép sàng lọc, loại bỏ sớm những phôi bất thường về mặt di truyền, tăng chất lượng thai nhi.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thay thế quy trình sinh thiết mẫu cổ điển, mở ra hướng mới, cho phép chẩn đoán phôi an toàn, không cần sinh thiết mẫu, chẩn đoán sớm, giảm được rủi ro liên quan, ảnh hưởng đến chất lượng, cũng như sức sống của phôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nuôi cấy phôi và thu hồi ADN từ phôi để sàng lọc di truyền không xâm lấn bao gồm các bước:

- a) thu nhận noãn bằng cách tách cụm phức hợp noãn/tế bào nang từ mẫu sinh thiết tế bào buồng trứng và chuyển lên đĩa nuôi cấy chứa dung dịch thu nhận noãn và phôi bổ sung albumin huyết thanh của người ở pH=7,3 để tách phức hợp noãn, phức hợp này được rửa 5 lần bằng dung dịch nhận noãn và phôi này, sau đó chuyển phức hợp này vào môi trường nuôi phôi chứa albumin huyết thanh người và gentamixin và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ rồi tách lớp tế bào nang xung quanh noãn bằng cách rửa trong môi trường tách noãn chứa enzym hyaluronidase trong khoảng từ 5 đến 50 giây, sau đó noãn không chứa tế bào nang được chuyển sang môi trường nuôi cấy noãn;
- b) tạo phôi trong ống nghiệm bằng cách cố định noãn vào đĩa cấy noãn sao cho thể cực được giữ với góc nghiêng từ 0 đến 15° theo chiều thẳng đứng và tiêm tinh trùng vào màng bào tương noãn theo chiều vuông góc với thể cực bằng vi kim đến vùng bào tương ở vị trí khoảng từ 1/2 đến 1/3 đường kính bào tương noãn và phá vỡ màng bào tương, sau khi tiêm, noãn được nuôi trong môi trường nuôi cấy khoảng 18 đến 19 giờ, thu nhận được phôi giai đoạn tiền nhân phát triển bình thường;
- c) nuôi cấy phôi đơn giọt bằng cách lựa chọn từng phôi giai đoạn tiền nhân và chuyển sang đĩa nuôi cấy đơn chứa 30μl môi trường nuôi cấy phôi, tiến hành nuôi ở 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ đến ngày thứ ba, tiếp đó từng phôi được rửa tuần tự qua 4 giọt môi trường nuôi cấy đã được cân bằng ở 37°C, 6% CO₂ và phủ dầu parafin 3mm trước 1 ngày và chuyển vào môi trường nuôi cấy đơn giọt chứa 15μl môi trường nuôi cấy;
- d) đục lỗ phôi nuôi cấy bằng cách chiếu tia laze ở bước sóng 650nm, độ rộng xung 0,012ms, kích thước 8μm để tạo một lỗ trên màng trong suốt của phôi với kích thước 8μm và tiếp tục nuôi cấy phôi trong môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 6% CO₂, 5% O₂ trong 2 ngày để phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang thu dịch nuôi cấy; và
- e) thu hồi ADN tự do của phôi bằng cách chuyển dịch nuôi cấy vào ống ly tâm thu được mẫu chứa ADN tự do của phôi,

trong đó, quy trình này không nhằm mục đích điều trị.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước khử ADN tạp nhiễm trên dụng cụ và thiết bị nuôi cấy bằng cách vệ sinh bằng dung dịch NaClO_2 2% và chiếu tia cực tím với bước sóng 253,7 nm cường độ 54W trong thời gian 30 phút để phá hủy ADN tạp nhiễm trước khi thực hiện các bước của quy trình.

HÌNH 1

