



(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)



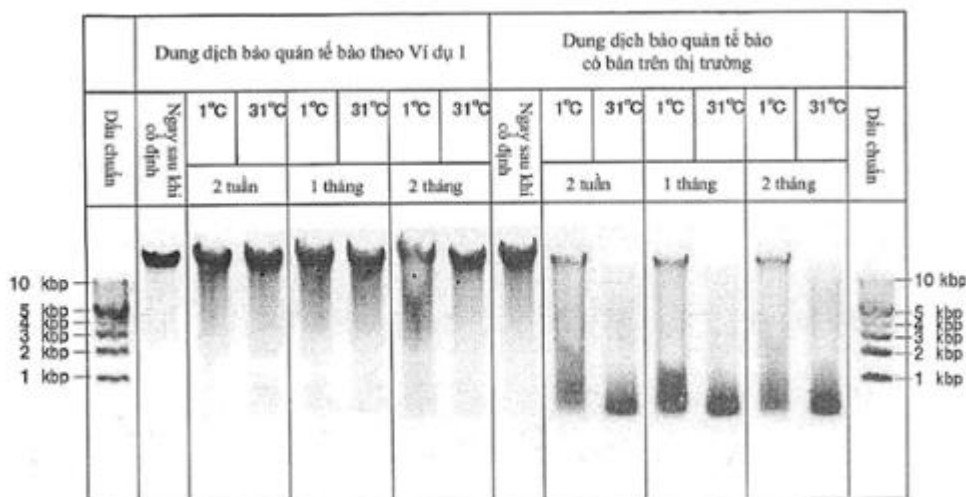
1-0034941

(51)⁸ C12N 1/04; C12N 11/16; C12N 5/071; (13) B
G01N 33/50; C12Q 1/04; C12Q 1/68;
G01N 33/48; C12N 1/00; C12N 5/09

- (21) 1-2017-02991 (22) 29/06/2016
(86) PCT/JP2016/069280 29/06/2016 (87) WO2017/002861 05/01/2017
(30) 2015-131552 30/06/2015 JP; 2016-037266 29/02/2016 JP
(45) 27/03/2023 420 (43) 25/10/2017 355A
(73) SYSMEX CORPORATION (JP)
5-1, Wakinohama-kaigandori 1-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 6510073, Japan
(72) YOKOYAMA, Koji (JP); OKA, Noriko (JP); MORITA, Masakatsu (JP);
YAMAMOTO, Yuka (JP).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN TẾ BÀO, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT DUNG DỊCH BẢO QUẢN TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TẾ BÀO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bảo quản tế bào, phương pháp thu nhận tế bào cố định, và phương pháp phân tích tế bào, bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào thu được.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến dung dịch bảo quản tế bào, cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp bảo quản tế bào, phương pháp thu nhận tế bào cố định, và phương pháp phân tích tế bào bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi phân tích tế bào, các tế bào luôn phải được lưu giữ trước khi đưa đi phân tích. Ví dụ, khi phân tích tế bào được lấy ra từ cơ thể sống, cần phải lưu giữ một cách thích hợp các tế bào này trong khoảng thời gian từ thời điểm lấy tế bào ra tới thời điểm phân tích tế bào, vì từ lúc tách khỏi cơ thể sống các tế bào này đã bắt đầu tự phân giải.

Tài liệu sáng chế 1 đề cập tới các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào trước khi phân tích. Ví dụ 5 của Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ dung dịch bảo quản tế bào chứa 1 mM magie axetat, 2 mM canxi axetat, 10 mM kali clorua, 0,1% natri clorua, và 20% metanol.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: US 5,256,571

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Các tác giả sáng chế này thấy rằng khi tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào thông thường trong khoảng thời gian định trước, thì các axit nucleic trong các tế bào này có thể không còn ổn định và bị thoái hóa. Do đó, có nhu cầu phát triển loại dung dịch bảo quản tế bào mới trong đó các tế bào này có thể được lưu giữ một cách ổn định hơn *in vitro* sau khoảng thời gian định trước.

Cách thức giải quyết vấn đề

Sáng chế đề xuất dung dịch bảo quản tế bào chứa rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L.

Sáng chế đề xuất phương pháp bảo quản tế bào, bao gồm bước ngâm các tế bào này *in vitro* trong dung dịch bảo quản tế bào nêu trên.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào, bao gồm bước trộn rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L.

Sáng chế đề xuất phương pháp thu nhận tế bào cố định, bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào nêu trên để làm cho các tế bào này được cố định.

Sáng chế đề xuất phương pháp phân tích tế bào bao gồm các bước: cho các tế bào tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào nêu trên để làm cho các tế bào này được cố định; và phân tích axit nucleic trong các tế bào đã được cố định trong bước trước đó.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, các tế bào cần được phân tích có thể được lưu giữ ổn định *in vitro* trong khoảng thời gian định trước trước khi đưa đi phân tích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig. 1 là ảnh chụp kết quả điện di trên gel agarosa của ADN chiết từ các tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này hoặc trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường dưới các điều kiện định trước.

Fig. 2A là đồ thị thể hiện các trị số đo được bằng cách lưu giữ các tế bào cô tách từ đối tượng trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường dưới các điều kiện định trước và phát hiện các axit nucleic có nguồn gốc từ virus u nhú ở người (HPV - Human Papilloma Virus) trong ADN của các tế bào này bằng phương pháp bắt giữ thể lai (HC - Hybrid Capture).

Fig. 2B là đồ thị thể hiện các trị số đo được bằng cách lưu giữ các tế bào cô tách từ đối tượng trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường dưới các điều kiện định trước và phát hiện các axit nucleic có nguồn gốc từ HPV trong ADN của các tế bào này bằng phương pháp HC.

Fig. 3A là đồ thị thể hiện các trị số đo được bằng cách lưu giữ các tế bào cô tách từ đối tượng trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này dưới các điều kiện định trước và phát hiện các axit nucleic có nguồn gốc từ HPV trong ADN của các tế bào này bằng phương pháp HC.

Fig. 3B là đồ thị thể hiện các trị số đo được bằng cách lưu giữ các tế bào cô tách từ đối tượng trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này dưới các điều kiện định trước và phát hiện các axit nucleic có nguồn gốc từ HPV trong ADN của các tế bào này bằng phương pháp HC.

Fig. 4 là ảnh chụp sau khi các tế bào cô tách từ đối tượng được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này hoặc trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường trong 2 ngày ở nhiệt độ trong phòng và nhuộm bằng phương pháp Papanicolaou.

Fig. 5 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion magie khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế (flow cytometer).

Fig. 6 là biểu đồ thể hiện miền xuất hiện tế bào lưỡng bội trên biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích các tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này ở nhiệt độ 25°C trong khoảng thời gian 4 giờ bằng lưu bào kế.

Fig. 7A là đồ thị thể hiện các hệ số biến thiên (CV - Coefficients of Variation) của vùng phát xạ huỳnh quang trong miền xuất hiện tế bào lưỡng bội trong trường hợp tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion magie khác nhau ở nhiệt độ 25°C trong khoảng thời gian 4 giờ hoặc ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ.

Fig. 7B là đồ thị thể hiện các hệ số biến thiên (CV) của vùng phát xạ huỳnh quang trong miền xuất hiện tế bào lưỡng bội trong trường hợp tế bào HeLa được lưu

giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion magie khác nhau ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 24 giờ.

Fig. 8A là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ metanol khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 8B là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ metanol khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 8C là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ metanol khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 9 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích các tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào với pH bằng 6,4 hoặc 7,0 dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 10 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion canxi khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 11 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 12 là hình phối cảnh thể hiện một ví dụ của dung dịch bảo quản tế bào được chứa trong lọ.

Fig. 13 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion canxi khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 14 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào chứa ion magie và ion canxi dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 15 là biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích các tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào chứa etanol dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 16 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HeLa được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 hoặc trong dung dịch bảo quản tế bào theo patent Mỹ số 5,256,571 dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Fig. 17 là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được bằng cách phân tích tế bào HUVEC được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ ion magie khác nhau dưới các điều kiện định trước bằng lưu bào kế.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Dung dịch bảo quản tế bào

Dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này chứa rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L.

Rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon này (dưới đây được gọi một cách ngắn gọn là “rượu bậc thấp”) không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó có thể được trộn với nước với tỷ lệ tùy ý ở nhiệt độ thông thường (25°C). Ví dụ về rượu này gồm metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, tert-butanol, rượu n-amyl, rượu isoamyl, rượu sec-amyl, rượu tert-amyl, 1-etyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol, n-hexanol, và xyclohexanol. Trong số các rượu này, metanol hoặc etanol là được ưu tiên, và metanol là được đặc biệt ưu tiên xét trên khía cạnh hiệu quả lưu giữ và cố định tế bào (quá trình loại nước và đông tụ của protein).

Theo phương án của sáng chế này, chỉ một loại rượu bậc thấp hoặc hai hoặc nhiều loại rượu bậc thấp có thể được sử dụng. Hai hoặc nhiều loại rượu như vậy có thể được trộn với tỷ lệ tùy ý. Ví dụ, hỗn hợp rượu thu được bằng cách trộn metanol và etanol với tỷ lệ tùy ý có thể được sử dụng làm dung dịch bảo quản tế bào trong sáng chế này.

Nồng độ của rượu bậc thấp trong dung dịch bảo quản tế bào này có thể được chọn một cách thích hợp tùy theo thời gian lưu giữ tế bào, phương pháp phân tích tế bào hoặc các yếu tố tương tự. Nồng độ quá thấp (ví dụ, trong trường hợp khi nồng độ này thấp hơn khoảng 20% tính theo thể tích) sẽ gây khó khăn cho việc lưu giữ ổn định tế bào. Nồng độ quá cao (ví dụ, trong trường hợp khi nồng độ này cao hơn khoảng 60% tính theo thể tích) có thể gây cố định quá mức tế bào. Theo phương án của sáng chế này, nồng độ của rượu bậc thấp thường nằm trong khoảng từ 20% tính theo thể tích tới 60% tính theo thể tích, tốt hơn nếu trong khoảng từ 30% tính theo thể tích tới 50% tính theo thể tích, và đặc biệt tốt nếu trong khoảng từ 40% tính theo thể tích tới 45% tính theo thể tích. Theo một phương án khác, nồng độ của rượu bậc thấp này nằm trong khoảng từ 20% tính theo thể tích tới 60% tính theo thể tích, tốt hơn nếu từ 30% tính theo thể tích tới 50% tính theo thể tích, và đặc biệt tốt nếu từ 40% tính theo thể tích tới 45% tính theo thể tích. Rượu bậc thấp này được chứa ở các nồng độ nêu trên sao cho các tế bào có thể được lưu giữ một cách ổn định. Ngoài ra, chúng cũng có thể có hiệu quả kìm khuẩn hoặc hiệu quả diệt khuẩn. Ở đây cần lưu ý rằng tỷ lệ “% tính theo thể tích” cũng được ký hiệu bằng “% thể tích/thể tích” hoặc “% thể tích”.

Ion kim loại hóa trị hai nêu trên không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó không ảnh hưởng tới việc duy trì hình dạng và thành phần của các tế bào, và có thể được chọn từ, ví dụ, các ion kim loại được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào. Theo phương án của sáng chế này, các ví dụ về ion kim loại hóa trị hai này gồm ion magie, ion canxi, ion kẽm, ion sắt (II), ion đồng, ion stronti, và ion molybden. Trong số đó, các ion kim loại thuộc Nhóm II là được ưu tiên. Trong số các ion kim loại thuộc Nhóm II này, ion magie và ion canxi là được đặc biệt ưu tiên. Theo phương án của sáng chế này, chỉ một loại ion kim loại có hóa trị hai hoặc hai hoặc nhiều loại ion kim loại có hóa trị hai có thể được sử dụng.

Theo phương án của sáng chế, tốt hơn nếu ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này được cấp từ hợp chất kim loại có hóa trị hai dễ tan trong dung môi nước. Ví dụ về các hợp chất này gồm các muối của kim loại có hóa trị hai với axit vô cơ hoặc hữu cơ. Ví dụ về muối của kim loại có hóa trị hai với axit vô cơ gồm muối của các axit vô cơ (như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit pecloric, axit bromhydric, và axit hydriodic) với các kim loại có hóa trị hai. Ví dụ về muối của kim loại có hóa trị hai với axit hữu cơ gồm các muối của các axit hữu cơ (như axit axetic,

axit xitric, axit ascorbic, và axit oxalic) với các kim loại có hóa trị hai. Trong số đó, các muối của kim loại có hóa trị hai với axit vô cơ là được ưu tiên. Ví dụ về các muối này gồm magie clorua, magie sulfat, và canxi clorua. Theo phương án của sáng chế này, hợp chất kim loại có hóa trị hai có thể là anhydrit hoặc hydrat.

Về nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này, các tác giả sáng chế đã xác định được rằng, trong dung dịch bảo quản tế bào chứa rượu bậc thấp là thành phần chính, nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này cần nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L, nhờ đó các tế bào và các axit nucleic trong các tế bào này có thể được lưu giữ ổn định *in vitro* trong khoảng thời gian định trước. Theo phương án của sáng chế này, tốt hơn nếu nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 80mmol/L, và tốt hơn nữa nếu từ 10mmol/L tới 60mmol/L. Theo một phương án khác, nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L, tốt hơn nếu từ 6mmol/L tới 80mmol/L, và tốt hơn nữa nếu từ 10mmol/L tới 60mmol/L. Ở đây cần lưu ý rằng “mmol/L” cũng được ký hiệu là “mM”. Theo phương án của sáng chế này, trong trường hợp khi hợp chất kim loại có hóa trị hai dễ tan trong dung môi nước, đặc biệt là muối của kim loại có hóa trị hai với axit vô cơ, được hoà tan trong dung dịch bảo quản tế bào này, thì nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này trong dung dịch bảo quản tế bào có thể là được thể hiện bằng nồng độ của hợp chất này.

Dung môi nước này có thể được trộn với rượu bậc thấp với tỷ lệ tùy ý ở nhiệt độ thông thường (25°C) và không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó không ảnh hưởng tới việc duy trì hình dạng và thành phần của các tế bào. Ví dụ về dung môi nước này gồm nước, nước muối sinh lý, dung dịch đệm, dung dịch albumin, dung dịch dextran, dung dịch huyết thanh của người hoặc động vật có vú bình thường, và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Tốt hơn nếu dung dịch đệm này được dùng làm dung môi nước. Dung dịch đệm này không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó là dung dịch đệm có tác dụng đệm ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 tới 8. Ví dụ về các dung dịch đệm này gồm dung dịch đệm tốt, dung dịch đệm phosphat (PBS), dung dịch đệm imidazol, và dịch đệm trietanolamin hydroclorua (TEA). Ví dụ về dung dịch đệm tốt gồm dung dịch nước của các chất đệm như PIPES, MES, Bis-Tris, ADA, Bis-Tris-Propan, ACES, MOPS, MOPSO, BES, TES, HEPES, HEPPS, Tricine, Tris, Bicine, và TAPS. Trong trường hợp sử dụng dung

môi nước khác với dung dịch đệm, chất đệm bất kỳ dùng trong các dung dịch đệm nêu trên có thể được bổ sung vào dung dịch bảo quản tế bào.

Theo phương án của sáng chế này, độ pH của dung dịch bảo quản tế bào có thể nằm trong khoảng thích hợp để lưu giữ tế bào, và thường nằm trong khoảng từ 6 tới 8, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6,4 tới 7. Theo một phương án khác, độ pH của dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 6 tới 8 và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6,4 tới 7. Áp suất thẩm thấu của dung dịch bảo quản tế bào này không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó không ngăn cản việc lưu giữ tế bào, và nó có thể là dung dịch đẳng trương sinh lý.

Nếu cần, dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này có thể chứa chất phụ gia trong dung môi nước, ngoài rượu bậc thấp và ion kim loại hóa trị hai nêu trên. Chất phụ gia này không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó không ngăn cản việc cố định, lưu giữ và phân tích tế bào. Ví dụ về chất phụ gia này gồm các chất đã biết như muối vô cơ (như natri clorua, kali clorua), sacarit (như glucoza, trehaloza), chất bảo quản (như natri azit, phenylmetansulfonyl florua), chất ổn định protein (như albumin huyết thanh bò), chất chống tạo bọt (như etylen glycol), thuốc kháng sinh (như penixilin, streptomycin), và chất chống nấm (như amphotericin B).

Các tế bào cần được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo sáng chế này không bị hạn chế đặc biệt và có thể là, ví dụ, tế bào của các sinh vật đa bào, tế bào của các sinh vật đơn bào hoặc các dòng tế bào được nuôi cấy. Tế bào của các sinh vật đa bào này có thể là các tế bào được lấy ra từ cơ thể sống hoặc có thể là các tế bào được lấy từ tử thi. Ví dụ về tế bào của các sinh vật đa bào này gồm các tế bào được tách ra từ động vật có vú như người. Các ví dụ cụ thể gồm tế bào cổ, tế bào bên trong thân tử cung, tế bào vùng miệng, tế bào tuyến vú, tế bào tuyến giáp, tế bào trong nước tiểu, tế bào trong nước dãi, tế bào thu được bằng phương pháp chải phết quần, tế bào trong dịch rửa màng bụng, và tế bào trong dịch thể khoang. Ngoài ra, các tế bào này còn có thể là các tế bào chứa trong mô được tách ra từ động vật có vú như người. Các mô được tách ra này có thể là các mô bình thường hoặc các mô có thương tổn. Ví dụ về tế bào chứa trong các mô được tách ra này gồm các tế bào được nuôi cấy sơ cấp, các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn trong dây rốn, và các tế bào u bướu chứa trong các mô u bướu được tách ra bằng cách phẫu thuật hoặc sinh thiết. Các tế bào này có thể là các động vật nguyên sinh như *Trichomonas* hoặc nấm như *Candida*. Các tế bào này có thể

là các tế bào được tạo ra một cách nhân tạo *in vitro* như các tế bào gốc hoặc các tế bào iPS. Đặc tính của các tế bào này không bị hạn chế đặc biệt và các tế bào này có thể là các tế bào bình thường, các tế bào bất tử, các tế bào ung thư hoặc các tế bào tương tự.

Fig. 12 thể hiện một ví dụ về ngoại hình của dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này. Trên hình này, 11 biểu thị lọ chứa dung dịch bảo quản tế bào. Lọ chứa dung dịch bảo quản tế bào theo phương án này có thể được đựng trong hộp và sau đó được cung cấp cho người dùng. Hộp này có thể có tờ hướng dẫn đi kèm mô tả phương pháp sử dụng dung dịch bảo quản tế bào này. Ngoài ra, khi dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này được cung cấp để lưu giữ tế bào cổ, thì hộp này có thể còn có dụng cụ lấy mẫu tế bào để tách lấy tế bào từ cổ tử cung (chẳng hạn như cái tăm bông, bàn chải).

2. Phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào

Dưới đây, phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào theo phương án của sáng chế (dưới đây được gọi một cách đơn giản là “phương pháp sản xuất”) sẽ được mô tả. Theo một phương án của sáng chế này, phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào bao gồm bước trộn rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước sao cho nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L. Lưu ý rằng các nồng độ và loại rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai này cũng chính là các nồng độ, loại rượu và ion kim loại đã được đề cập trong đoạn mô tả dung dịch bảo quản tế bào nêu trên.

Theo phương án của sáng chế này, tốt hơn nếu hợp chất kim loại có hóa trị hai dễ tan trong dung môi nước (dưới đây được gọi một cách đơn giản là “hợp chất kim loại”) được dùng làm ion kim loại hóa trị hai này. Cần lưu ý rằng hợp chất này cũng chính là hợp chất đã được đề cập trong đoạn mô tả dung dịch bảo quản tế bào nêu trên. Hợp chất kim loại được dùng trong phương pháp theo một phương án của sáng chế này có thể ở dạng dung dịch, hoặc có thể ở dạng rắn (chẳng hạn như bột hoặc tinh thể).

Rượu bậc thấp được dùng trong phương pháp theo một phương án của sáng chế này có thể là rượu tuyệt đối. Theo cách khác, trong chừng mực mà rượu bậc thấp này có thể được kiểm soát để có được nồng độ nêu trên, rượu này có thể là rượu ngâm nước.

Theo phương án của sáng chế này, không có giới hạn đặc biệt đối với việc bổ sung rượu bậc thấp và hợp chất kim loại với vai trò ion kim loại hóa trị hai vào dung môi nước. Ví dụ, hợp chất kim loại có thể được trộn vào sau khi trộn rượu bậc thấp và dung môi nước, hoặc rượu bậc thấp có thể được bổ sung sau khi trộn hợp chất kim loại và dung môi nước. Ngoài ra, rượu bậc thấp và ion kim loại hóa trị hai có thể được trộn vào dung môi nước hầu như là đồng thời. Các điều kiện trộn không bị hạn chế đặc biệt, và quá trình trộn có thể được tiến hành, ví dụ, ở nhiệt độ thông thường dưới áp suất thông thường (ví dụ, ở 25°C dưới áp suất 1 at (100 kPa)).

Theo phương án của sáng chế này, tốt hơn nếu độ pH của hỗn hợp thu được như đã mô tả trên đây được điều chỉnh đến khoảng từ 6 tới 8, tốt hơn nếu đến khoảng từ 6,4 tới 7, bằng cách sử dụng kiềm như natri hydroxit hoặc axit như axit clohydric. Theo một phương án khác, tốt hơn nếu độ pH của hỗn hợp này được điều chỉnh đến khoảng từ 6 tới 8, tốt hơn nếu đến khoảng từ 6,4 tới 7.

Theo phương án của sáng chế này, ngoài rượu bậc thấp và ion kim loại hóa trị hai đã nêu, còn có thể bổ sung chất phụ gia, nếu cần. Lưu ý rằng chất phụ gia này cũng chính là chất phụ gia đã được đề cập trong đoạn mô tả dung dịch bảo quản tế bào nêu trên.

3. Phương pháp bảo quản tế bào bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào

Phương pháp bảo quản tế bào (dưới đây được gọi một cách đơn giản là “phương pháp bảo quản”) theo một phương án của sáng chế sẽ được mô tả trong phần dưới đây. Phương pháp bảo quản theo phương án này gồm bước ngâm các tế bào *in vitro* trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này.

Các tế bào được sử dụng trong phương pháp bảo quản theo phương án này cũng chính là các tế bào đã được mô tả ở phần trên.

Theo một phương án của sáng chế, các tế bào này được ngâm *in vitro* trong một lượng đủ (ví dụ, với lượng bằng từ 100 tới 1000 lần thể tích của các tế bào) của dung dịch bảo quản tế bào, nhờ đó cố định các tế bào này. Sau đó, các tế bào này có thể được lưu giữ trong khoảng thời gian định trước. Nếu cần, sau khi được ngâm trong dung dịch bảo quản, các tế bào này có thể được khuấy ở mức sao cho tạo ra được dịch huyền phù mà không làm tổn hại các tế bào này. Trước khi được ngâm trong dung dịch bảo quản tế bào, các tế bào này có thể được rửa bằng PBS hoặc các dung dịch tương tự.

Sau khi được tách ra từ cơ thể sống, các tế bào này bắt đầu tự phân giải ngay lập tức, dẫn đến làm biến dạng tế bào và cấu trúc nhân, gây thoái hóa và biến đổi các thành phần của tế bào như axit nucleic và protein. Do đó, sẽ tốt hơn nếu các tế bào này được ngâm trong dung dịch bảo quản tế bào trong vòng muộn nhất là 1 phút sau khi tách. Lọ bảo quản không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó có thể được bịt kín bằng nắp đậy, miếng bít hoặc vật dụng tương tự. Ví dụ về lọ bảo quản này có thể là lọ nhỏ, ống nghiệm, vi ống, vi đĩa, đĩa và chai.

Tốt hơn nếu nhiệt độ khi ngâm tế bào trong dung dịch bảo quản tế bào (nhiệt độ khi cho tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào) là bằng 35°C hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 32°C hoặc thấp hơn, và còn tốt hơn nữa nếu bằng 30°C hoặc thấp hơn. Giới hạn dưới của nhiệt độ khi ngâm tế bào trong dung dịch bảo quản tế bào không bị giới hạn đặc biệt miễn là bước phân tích tiếp sau đó không bị ảnh hưởng bởi sự đóng băng của dung dịch bảo quản tế bào này và các tế bào này. Ví dụ, giới hạn dưới của nhiệt độ này có thể là 1°C hoặc cao hơn hoặc 2°C hoặc cao hơn. Phương pháp bảo quản theo phương án này có thể còn có bước cho tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào ở nhiệt độ nêu trên để làm cho các tế bào này được cố định.

Tốt hơn nếu nhiệt độ lưu giữ tế bào này là bằng 35°C hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa nếu bằng 32°C hoặc thấp hơn, và còn tốt hơn nữa nếu bằng 30°C hoặc thấp hơn. Khi được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này, các axit nucleic của tế bào có thể được duy trì một cách ổn định không những trong trường hợp lưu giữ ở trạng thái được làm lạnh mà còn cả trong trường hợp lưu giữ ở nhiệt độ phòng. Giới hạn dưới của nhiệt độ lưu giữ không bị giới hạn đặc biệt miễn là bước phân tích tiếp sau đó không bị ảnh hưởng bởi sự đóng băng của dung dịch bảo quản tế bào này và các tế bào này. Ví dụ, giới hạn dưới của nhiệt độ lưu giữ có thể là bằng 1°C hoặc cao hơn hoặc 2°C hoặc cao hơn. Phương pháp bảo quản theo phương án này có thể còn có bước lưu giữ tế bào trong dung dịch bảo quản tế bào ở nhiệt độ nêu trên trong khoảng thời gian định trước. Cần lưu ý rằng nhiệt độ vào thời điểm tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào và nhiệt độ lưu giữ tế bào này có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Dung dịch bảo quản tế bào này có thể được thay thế trong thời gian lưu giữ. Mặc dù tần suất thay thế dung dịch bảo quản tế bào này không bị giới hạn đặc biệt, nhưng dung dịch bảo quản tế bào này có thể được thay thế, ví dụ, 90 ngày một lần.

4. Phương pháp thu nhận tế bào cố định bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào

Phương pháp thu nhận tế bào cố định theo một phương án của sáng chế này (dưới đây được gọi một cách đơn giản là “phương pháp thu nhận”) sẽ được mô tả trong phần dưới đây. Phương pháp thu nhận theo phương án này gồm có bước cho các tế bào tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này để làm cho các tế bào này được cố định. Cần lưu ý rằng các tế bào được sử dụng trong phương pháp thu nhận theo phương án này cũng chính là các tế bào được mô tả trong phương pháp bảo quản tế bào nêu trên.

Theo phương án của sáng chế này, việc cho các tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào có thể được tiến hành bằng cách ngâm các tế bào này trong một lượng đủ (ví dụ, với lượng bằng từ 100 tới 1000 lần thể tích của các tế bào) của dung dịch bảo quản tế bào. Theo cách khác, việc cho các tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào có thể được tiến hành bằng cách đưa các tế bào này vào lọ chứa rộng và bổ sung vào đó một lượng đủ của dung dịch bảo quản tế bào. Trước khi được cho tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào, các tế bào này có thể được rửa bằng PBS hoặc dung dịch tương tự. Các tế bào này bắt đầu tự phân giải ngay sau khi được tách, dẫn đến làm biến dạng tế bào và cấu trúc nhân và gây thoái hóa và biến đổi các thành phần của tế bào như axit nucleic và protein. Do đó, sẽ tốt hơn nếu các tế bào này được cho tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào trong vòng muộn nhất là 1 phút sau khi tách. Lọ chứa dùng trong bước tiếp xúc này không bị giới hạn đặc biệt và có thể gồm lọ nhỏ, ống nghiệm, vi ống, vi đĩa, đĩa và chai. Nếu cần, lọ chứa này có thể được bịt kín bằng nắp đậy, miếng bít hoặc vật dụng tương tự.

Trong phương pháp thu nhận theo phương án này, các tế bào tiếp xúc với dung dịch bảo quản tế bào sẽ được cố định nhờ tác dụng của rượu bậc thấp chứa trong dung dịch bảo quản tế bào này (loại nước và đông tụ protein). Theo phương án của sáng chế này, thời gian tiếp xúc của các tế bào với dung dịch bảo quản tế bào không bị giới hạn đặc biệt miễn là các tế bào này được cố định một cách đầy đủ. Các điều kiện nhiệt độ vào thời điểm tiếp xúc cũng chính là các điều kiện đã được mô tả trong phương pháp bảo quản theo phương án này.

Theo phương án của sáng chế này, các tế bào cố định thu được có thể được sử dụng ngay hoặc sau khi được rửa bằng PBS hoặc dung dịch tương tự, làm các mẫu để

tiến hành phân tích mong muốn. Theo cách khác, các tế bào và dung dịch bảo quản tế bào này có thể được lưu giữ ở trạng thái tiếp xúc với nhau trước khi đưa đi phân tích. Các điều kiện lưu giữ tế bào này cũng chính là các điều kiện đã được mô tả trong phương pháp bảo quản nêu trên.

5. Phương pháp phân tích tế bào bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào

Phương pháp phân tích tế bào (dưới đây được gọi một cách đơn giản là “phương pháp phân tích”) theo một phương án của sáng chế sẽ được mô tả trong phần dưới đây. Trong phương pháp phân tích theo phương án này, các tế bào trước tiên được cho tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế để cố định các tế bào này. Các tế bào này, dung dịch bảo quản tế bào này, và phương pháp cố định các tế bào này cũng chính là các tế bào, dung dịch và phương pháp đã được mô tả ở phần trên.

Sau đó, các tế bào cố định thu được được mang đi phân tích để xác định các axit nucleic trong đó. Theo phương án của sáng chế này, tốt hơn nếu thu được thông tin về lượng các axit nucleic trong phân tích axit nucleic. Dạng thông tin về lượng các axit nucleic không bị giới hạn đặc biệt và có thể được xác định một cách thích hợp theo phương pháp thu nhận thông tin này. Thông tin về lượng axit nucleic này có thể là thông tin dạng số (ví dụ, trị số đo được), có thể là biểu đồ (ví dụ, đồ thị thu được trên cơ sở thông tin dạng số), hoặc có thể là thông tin dạng ảnh (ví dụ, hình vết nhuộm, ảnh chụp kết quả điện di gel).

Các axit nucleic trong các tế bào đã được cố định có thể là các axit nucleic có mặt từ đầu trong các tế bào này hoặc là các axit nucleic được đưa vào từ bên ngoài bằng cách nhập gen, làm nhiễm virus hoặc các cách tương tự. Loại axit nucleic có thể là ADN hoặc ARN. Theo phương án của sáng chế này, axit nucleic trong các tế bào đã được cố định có thể là cDNA hoặc cRNA được tổng hợp từ các axit nucleic được tách từ các tế bào cố định này.

Theo phương án của sáng chế này, phương pháp phân tích axit nucleic trong các tế bào đã được cố định có thể được chọn từ các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các phương pháp này gồm quan sát dưới kính hiển vi, trích lưu tế bào, thử nghiệm khuếch đại axit nucleic (ví dụ, thử nghiệm PCR, thử nghiệm RT-PCR, thử nghiệm PCR thời gian thực), thử nghiệm lai hóa (ví dụ, thử nghiệm lai hóa

Southern, thử nghiệm lai hóa Northern), phương pháp vi dàn (microarray), và phương pháp bắt giữ thể lai (HC) (xem Clavel C. et al., J. Clin. Pathol, vol. 51, p. 737-740 (1998)) (Clavel C. et al., J. Clin. Pathol, vol. 51, p. 737-740 (1998)).

Theo phương án của sáng chế này, tốt hơn nếu mẫu đo được điều chế từ các tế bào cố định này và sau đó mẫu này được phân tích. Mẫu đo này có thể được điều chế bằng cách phá vỡ các tế bào đã được cố định hoặc không cần phá vỡ các tế bào đã được cố định. Phương pháp điều chế bằng cách phá vỡ các tế bào đã được cố định có thể là, ví dụ, phương pháp tách axit nucleic từ các tế bào đã được cố định. Phương pháp điều chế không cần phá vỡ các tế bào đã được cố định có thể là, ví dụ, phương pháp nhuộm axit nucleic ở trạng thái khi hình dạng của các tế bào này được duy trì.

Phương pháp tách axit nucleic từ tế bào là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Khi tách ADN, ví dụ, các tế bào cố định được trộn với dịch dung giải tế bào chứa chất hoạt động bề mặt (chẳng hạn như natri cholat, natri dodecyl sulfat). Khi tách ARN, ví dụ, các tế bào cố định được trộn với dịch dung giải tế bào chứa guanidin thioxyanat và chất hoạt động bề mặt. Sau đó, hỗn hợp thu được được xử lý bằng phương pháp vật lý (ví dụ khuấy, đồng nhất hóa, phân mảnh bằng siêu âm) để các axit nucleic chứa trong mẫu sinh học được giải phóng vào hỗn hợp, nhờ đó tách được các axit nucleic. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu hỗn hợp thu được được ly tâm để làm kết tủa các mảnh vỡ từ tế bào và sau đó dịch nổi trên bề mặt chứa các axit nucleic tự do được dùng để phân tích. Theo cách khác, dịch nổi thu được trên bề mặt có thể được tinh chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc chiết và tinh chế các axit nucleic này từ tế bào cũng có thể được tiến hành bằng cách sử dụng bộ kit có bán trên thị trường.

Phương pháp nhuộm các axit nucleic mà vẫn duy trì được hình dạng của tế bào cũng đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các tế bào cố định trước tiên được cho tiếp xúc với dung dịch xử lý chứa chất hoạt động bề mặt (ví dụ, Nonidet (nhãn hiệu đã được đăng ký) P-40), Triton (nhãn hiệu đã được đăng ký) X-100), để tạo ra mức độ tổn thương nhất định trên màng tế bào sao cho thuốc nhuộm axit nucleic có thể lọt qua đó. Tiếp theo, các tế bào cố định thu được sau khi xử lý như vậy được cho tiếp xúc với dung dịch chứa thuốc nhuộm sao cho các axit nucleic có thể được nhuộm màu trong khi hình dạng của các tế bào cố định này vẫn được duy trì.

Thuốc nhuộm để nhuộm axit nucleic có thể được chọn một cách thích hợp từ các thuốc nhuộm axit nucleic đã biết phù hợp với phương pháp phân tích axit nucleic được dùng. Ví dụ, khi kính hiển vi quang học được sử dụng để thu thập thông tin, thì ví dụ về thuốc nhuộm axit nucleic này gồm có hematoxylin, pyronin Y (pyronin G), và methyl xanh lá cây. Ngoài ra, khi kính hiển vi huỳnh quang, lưu bào kế hoặc các thiết bị tương tự được sử dụng để thu thập thông tin, thì sẽ tốt hơn nếu sử dụng thuốc nhuộm phát huỳnh quang có khả năng nhuộm axit nucleic như các thuốc nhuộm axit nucleic. Ví dụ về thuốc nhuộm phát huỳnh quang này bao gồm propidium iốtua, ethidi bromua, heterodime ethidi-acridin, ethidi diazido, ethidi homodime-1, ethidi homodime-2, ethidi monoazit, Hoechst33342, Hoechst33258, 4',6-điamidino-2-phenylindol-đihydrochlorua (DAPI), trimetylen bis[[3-[[4-[[3-methylbenzothiazol-3-ium)-2-yl]metylen]-1,4-đihydroquinolin]-1-yl] propyl]đimetyl aminium]·tetraiođua (TOTO-1), 4-[(3-methylbenzothiazol-2(3H)-yliden)metyl]-1-[3-(trimetylaminiopropyl)quinolinium điiđua (TO-PRO-1), N,N,N',N'-tetra-metyl-N,N'-bis[3-[4-[3-[(3-methylbenzothiazol-3-ium)-2-yl]-2-propenyliden]-1,4-đihydroquinolin-1-yl]propyl]-1,3-propan điaminium·tetraiođua (TOTO-3), và 2-[3-[[1-[3-(trimetylaminiopropyl)-1,4-đihydroquinolin]-4-yliden]-1-propenyl]-3-methylbenzothiazol-3-ium·điiđua (TO-PRO-3).

Mẫu đo chứa các axit nucleic chiết từ tế bào cố định là thích hợp để dùng trong phương pháp phân tích nhằm phát hiện axit nucleic định trước trong các tế bào đã được cố định (ví dụ, phương pháp khuếch đại axit nucleic, phương pháp lai hóa, phương pháp vi đàn, phương pháp HC). Mẫu đo chứa các tế bào cố định, trong đó các axit nucleic được nhuộm đồng thời hình dạng của các tế bào cố định được duy trì, là thích hợp để dùng trong phương pháp phân tích nhằm thu thập thông tin về các axit nucleic trong các tế bào tương ứng (ví dụ, quan sát dưới kính hiển vi, trắc lưu tế bào). Theo phương án của sáng chế này, mẫu đo thích hợp được điều chế từ các tế bào cố định phù hợp với mục đích phân tích và phép phân tích có thể được tiến hành.

Khi các axit nucleic trong tế bào đã được cố định được phân tích bằng trắc lưu tế bào, thì tốt hơn nếu bước nhuộm các axit nucleic trong các tế bào đã được cố định được tiến hành giữa bước cố định các tế bào này và bước thu thập thông tin. Cách nhuộm các axit nucleic trong các tế bào cố định đã được mô tả trên đây. Các axit nucleic trong các tế bào đã được nhuộm và cố định được phân tích một cách thích hợp

bằng cách sử dụng kính hiển vi, trắc lưu tế bào hoặc các thiết bị tương tự. Mức độ nhuộm các tế bào này bằng thuốc nhuộm axit nucleic phụ thuộc chủ yếu vào lượng các axit nucleic nội bào. Cần lưu ý rằng cấu trúc của chất nhuộm sắc cũng có liên quan đến mức độ nhuộm (khả năng dễ được nhuộm) và mức độ nhuộm được coi là phụ thuộc nhất vào lượng các axit nucleic. Do đó, mức độ nhuộm của các tế bào được đo bằng kính hiển vi, trắc lưu tế bào hoặc các thiết bị tương tự sao cho có thể thu được thông tin về lượng các axit nucleic. Đặc biệt, khi sử dụng trắc lưu tế bào, các tế bào đã được nhuộm và cố định được đưa vào trong lưu bào kế và các tín hiệu huỳnh quang từ các tế bào này được thu lại. Trên cơ sở các tín hiệu huỳnh quang này, có thể thu được thông tin về lượng các axit nucleic.

Theo phương án của sáng chế này, trong phương pháp phân tích trên cơ sở trắc lưu tế bào, có thể sử dụng, ví dụ, thiết bị phân tích tế bào hoặc phương pháp phân tích tế bào được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0091746 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0091746 này được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Đặc biệt, nhiều loại tế bào, bao gồm cả “tế bào đích cần đo” trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0091746, có thể được cố định trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này và các tế bào đã được cố định này có thể được phân tích bằng thiết bị phân tích tế bào hoặc bằng phương pháp phân tích tế bào đã nêu.

Trong phương pháp đo bằng lưu bào kế, mẫu đo chứa các tế bào đã được nhuộm và cố định được đưa vào buồng mẫu (flow cell) của lưu bào kế và các tế bào này trong dòng chảy qua buồng mẫu này được chiếu sáng bằng ánh sáng, nhờ đó thu được thông tin quang học phát ra từ các tế bào tương ứng (thông tin về huỳnh quang phát xạ và thông tin về ánh sáng tán xạ).

Theo phương án của sáng chế này, thông tin về huỳnh quang phát xạ thu được là thông tin (ví dụ như dạng sóng, cường độ phát xạ huỳnh quang) thu được bằng cách chiếu ánh sáng kích thích có bước sóng thích hợp vào các tế bào tương ứng đã được nhuộm bằng thuốc nhuộm phát huỳnh quang và đo mức phát xạ huỳnh quang kích thích. Huỳnh quang này được phát ra từ các axit nucleic trong các tế bào đã được nhuộm bằng thuốc nhuộm phát huỳnh quang. Do đó, thông tin về huỳnh quang phát xạ này phản ánh lượng axit nucleic trong các tế bào đã được cố định. Cần lưu ý rằng bước

sóng của ánh sáng nhận được có thể được chọn một cách thích hợp tùy thuộc vào thuốc nhuộm phát huỳnh quang được sử dụng.

Theo phương án của sáng chế này, thông tin về ánh sáng tán xạ không bị giới hạn đặc biệt miễn là ánh sáng thu được là ánh sáng tán xạ có thể đo được bằng lưu bào kế có bán trên thị trường. Ví dụ, độ rộng của xung ánh sáng tán xạ và cường độ của ánh sáng tán xạ như ánh sáng tán xạ thẳng (ví dụ khi góc nhận ánh sáng nằm trong khoảng từ 0 tới 20 độ) và ánh sáng tán xạ bên (khi góc nhận ánh sáng xấp xỉ 90 độ) có thể được sử dụng làm thông tin về ánh sáng tán xạ. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng ánh sáng tán xạ bên phản ánh các thông tin bên trong như nhân hoặc hạt tế bào và ánh sáng tán xạ thẳng phản ánh thông tin về kích cỡ tế bào.

Theo phương án của sáng chế này, nguồn ánh sáng dùng trong lưu bào kế không bị giới hạn đặc biệt, và nguồn ánh sáng có bước sóng thích hợp để kích thích thuốc nhuộm phát huỳnh quang thường được chọn. Ví dụ, có thể sử dụng laze bán dẫn đỏ, laze bán dẫn xanh lam, laze argon, laze He-Ne hoặc đèn hồ quang thủy ngân. Đặc biệt, do laze bán dẫn có giá thành rẻ hơn nhiều so với laze khí, nên nó được ưu tiên.

Theo phương án của sáng chế này, từ các thông tin quang học nêu trên có thể thu được các thông số đặc trưng phản ánh lượng ADN chứa trong tế bào, kích cỡ của nhân, kích cỡ của tế bào hoặc các thông số tương tự, ví dụ, bằng cách phân tích dạng sóng tín hiệu. Các tế bào ung thư và không điển hình có thể được xác định bằng cách sử dụng các thông số đặc trưng này.

Trong phương pháp phân tích theo phương án này, bước phân tích axit nucleic trong các tế bào cố định còn có thể có bước phát hiện axit nucleic định trước trong các tế bào đã được cố định. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu sử dụng mẫu chứa axit nucleic được tách từ các tế bào cố định này làm mẫu đo.

Theo phương án của sáng chế này, axit nucleic định trước nêu trên không bị giới hạn đặc biệt, và axit nucleic tùy ý cần quan tâm có thể được phát hiện. Phương pháp phát hiện không bị giới hạn đặc biệt và tốt hơn nếu là phương pháp lai hóa có sử dụng polynucleotit có khả năng được lai hóa đặc hiệu với axit nucleic định trước (mẫu dò hoặc đoạn môi), phương pháp vi đàn, phương pháp HC, phương pháp khuếch đại axit nucleic hoặc các phương pháp tương tự. Polynucleotit được dùng có thể là ADN hoặc

ARN. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế được polynucleotit tương ứng với trình tự bazơ của axit nucleic định trước.

Thuật ngữ “có thể được lai hóa đặc hiệu với” được dùng ở đây có nghĩa là polynucleotit dưới dạng mẫu dò hoặc đoạn mồi có thể được lai hóa với axit nucleic định trước dưới các điều kiện nghiêm ngặt. Ở đây, các điều kiện nghiêm ngặt này là các điều kiện trong đó polynucleotit có thể được lai hóa với axit nucleic định trước với khả năng phát hiện được ở mức cao, so với các axit nucleic khác với axit nucleic định trước (ví dụ, ít nhất là lớn hơn hai lần mức cơ sở). Cần lưu ý rằng các điều kiện nghiêm ngặt này thường phụ thuộc vào trình tự và là khác nhau trong các môi trường khác nhau. Nói chung, các điều kiện nghiêm ngặt này được chọn theo cách sao cho điểm nhiệt độ nóng chảy (T_m) thấp hơn khoảng 5°C so với điểm nhiệt độ nóng chảy của một trình tự đặc trưng ở nồng độ ion và độ pH đặc trưng. Điểm T_m là nhiệt độ mà tại đó 50% polynucleotit bổ trợ với trình tự bazơ của axit nucleic định trước được lai hóa ở trạng thái cân bằng (tùy thuộc vào nồng độ ion, độ pH cụ thể, và thành phần của các axit nucleic).

Theo phương án của sáng chế này, mẫu dò được dùng có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về chất đánh dấu bao gồm các chất phóng xạ như ^{32}P , ^{35}S , ^3H , và ^{125}I ; các chất phát huỳnh quang như florexin và Alexa Fluor (nhãn hiệu đã được đăng ký); các enzym như phosphatase kiềm và peroxidase cải ngựa; hapten như nhóm 2,4-dinitrophenyl, biotin, và avidin. Trong trường hợp phát hiện axit nucleic bằng phương pháp HC, thì tốt hơn nếu các kháng thể lai kháng ADN/ARN được đánh dấu bằng các chất đánh dấu này. Ngoài ra, trong trường hợp phát hiện axit nucleic bằng phương pháp vi đàn, thì tốt hơn nếu các axit nucleic trong mẫu đo được đánh dấu bằng các chất đánh dấu nêu trên.

Theo phương án của sáng chế này, các axit nucleic có thể được phát hiện như sau. Trong phương pháp lai hóa, bằng cách phát hiện tín hiệu từ mẫu dò đã được đánh dấu và được lai hóa đặc hiệu với axit nucleic định trước, có thể phát hiện được axit nucleic định trước này. Trong phương pháp vi đàn, khi axit nucleic đã được đánh dấu và lai hóa đặc hiệu với mẫu dò được đưa lên vi đàn, bằng cách phát hiện tín hiệu từ axit nucleic đã được đánh dấu này, có thể phát hiện được axit nucleic định trước. Cần lưu ý rằng thuật ngữ “phát hiện tín hiệu” được dùng ở đây bao gồm cả việc phát hiện định tính sự có mặt hoặc không có mặt của tín hiệu, định lượng cường độ tín hiệu, và phát

hiện bán định tính cường độ tín hiệu này ở nhiều mức độ, như “không có tín hiệu”, “tín hiệu yếu” hoặc “tín hiệu mạnh”.

Trong phương pháp khuếch đại axit nucleic, dung dịch phản ứng thu được sau khi khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi bổ trợ với trình tự bazơ của axit nucleic định trước được đưa vào điện di gel, và từ đó xác nhận được sự có mặt hoặc không có mặt của sản phẩm đã được khuếch đại. Khi có mặt sản phẩm đã được khuếch đại, có thể phát hiện được axit nucleic định trước. Theo cách khác, trong thử nghiệm PCR thời gian thực có sử dụng chất phát huỳnh quang cài xen vào ADN (ví dụ như SYBR (nhãn hiệu đã được đăng ký) Xanh lá cây I) hoặc mồi dò TaqMan (nhãn hiệu), bằng cách phát hiện tín hiệu từ chất phát huỳnh quang hoặc mồi dò này trong dung dịch phản ứng sau khi hoặc trong khi khuếch đại, có thể phát hiện được axit nucleic định trước.

Trong phương pháp HC, thể lai của axit nucleic định trước (ADN) và mồi dò ARN đã được lai hóa đặc hiệu với axit nucleic được bẫy bằng kháng thể trên pha rắn và kháng thể đã được đánh dấu và tín hiệu từ kháng thể đã được đánh dấu này được phát hiện, nhờ đó có thể phát hiện được axit nucleic định trước.

Theo phương án của sáng chế này, các tế bào tách ra từ cổ tử cung được cô định trong dung dịch bảo quản tế bào theo sáng chế này. Axit nucleic định trước, tức axit nucleic có nguồn gốc từ virus u nhú ở người (HPV), có thể được phát hiện trong các tế bào này. Sự nhiễm HPV làm cho ADN của HPV được kết hợp vào ADN trong bộ gen của tế bào chủ. Do đó, khi phát hiện được axit nucleic có nguồn gốc từ HPV trong các tế bào được tách ra từ cổ tử cung của đối tượng, có thể xác định được rằng đối tượng này bị nhiễm HPV.

HPV được phân loại ra thành hơn 100 kiểu phụ. Theo phương án của sáng chế này, HPV cần phát hiện không bị giới hạn đặc biệt và có thể là tùy ý được chọn từ các kiểu phụ đã biết. Ví dụ, có thể phát hiện được axit nucleic có nguồn gốc từ HPV kiểu nguy cơ cao which được cho là có nhiều khả năng gây ung thư cổ. Ví dụ về HPV kiểu nguy cơ cao này gồm có HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73, và HPV-82.

Phương pháp phát hiện axit nucleic có nguồn gốc từ HPV có thể được chọn một cách thích hợp từ các phương pháp phát hiện đã biết. Ví dụ, axit nucleic có nguồn gốc

từ HPV có thể được phát hiện bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic có sử dụng đoạn mồi có khả năng khuếch đại ADN trong bộ gen của HPV cần phát hiện. Ngoài ra, axit nucleic có nguồn gốc từ HPV có thể được phát hiện bằng phương pháp lai hóa hoặc phương pháp HC có sử dụng mẫu dò có khả năng lai hóa đặc hiệu với ADN trong bộ gen của HPV. Cần lưu ý rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế được đoạn mồi và mẫu dò tương ứng với trình tự bazơ của ADN trong bộ gen của HPV. Để phát hiện axit nucleic có nguồn gốc từ HPV, có thể sử dụng bộ kit phát hiện HPV có bán trên thị trường.

Các tế bào được cố định trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này có thể được phân tích không những bằng phương pháp phân tích axit nucleic mà còn bằng phương pháp phân tích kích cỡ và hình dạng của tế bào, nhân hoặc các thông số tương tự. Khi phân tích kích cỡ và hình dạng của tế bào, nhân hoặc các thông số tương tự, ví dụ, lưu bào kế và kính hiển vi có thể được sử dụng.

Khi sử dụng lưu bào kế, thông tin về ánh sáng tán xạ và thông tin về huỳnh quang phát xạ thu được bằng cách cho các tế bào có nhân được nhuộm chất phát huỳnh quang đi qua buồng mẫu và chiếu xạ các tế bào này bằng ánh sáng. Trên cơ sở thông tin thu được, có thể phát hiện các tế bào không bình thường. Lưu bào kế được dùng, ví dụ, có thể là thiết bị được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2015/0104786. Ngoài ra, có thể sử dụng thiết bị phân tích tế bào tróc vảy LC-1000 (Sysmex Corporation) có bán trên thị trường.

Ngoài ra, lưu bào kế có chức năng ghi hình có thể được sử dụng. Các tế bào tương ứng chảy qua buồng mẫu được ghi hình và người có hiểu biết trung bình về bệnh học hoặc những người có hiểu biết trung bình khác có thể quan sát các tế bào đã được ghi hình, nhờ đó cho phép phát hiện các tế bào không bình thường.

Khi sử dụng kính hiển vi, ví dụ, các tế bào được phân tích theo cách sao cho các tế bào đã được cố định trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này được nhuộm, các tế bào thu được được đưa lên kính vật, và sau đó được quan sát bằng kính hiển vi. Dưới kính hiển vi, những người có hiểu biết trung bình về bệnh học hoặc những người có hiểu biết trung bình khác có thể quan sát các tế bào này. Hình vết nhuộm được chụp ảnh bằng kính hiển vi có chức năng ghi hình và những người có hiểu biết trung bình về bệnh học hoặc những người có hiểu biết trung bình

khác có thể quan sát ảnh chụp này. Việc đưa các tế bào này lên kính vật có thể được tiến hành một cách thủ công bởi người có hiểu biết trung bình về bệnh học hoặc những người có hiểu biết trung bình khác, hoặc có thể là được tiến hành tự động bằng cách sử dụng thiết bị chuẩn bị mẫu. Thiết bị chuẩn bị mẫu này có thể là thiết bị được mô tả trong patent Mỹ số 5240606. Ngoài ra, có thể sử dụng thiết bị chuẩn bị mẫu có bán trên thị trường như bộ xử lý ThinPrep (nhãn hiệu đã được đăng ký).

Tiếp theo, sáng chế mô tả việc sử dụng dung dịch bảo quản tế bào theo sáng chế này để lưu giữ tế bào. Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng dung dịch bảo quản tế bào này để thu nhận các tế bào cố định. Tiếp nữa, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng dung dịch bảo quản tế bào này để phân tích tế bào. Các tế bào cần được cố định, lưu giữ hoặc phân tích cũng chính là các tế bào đã được mô tả ở phần trên. Thành phần của dung dịch bảo quản tế bào được sử dụng cũng chính là thành phần đã được mô tả ở phần trên.

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn chỉ ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này và sau đó độ ổn định lưu giữ của ADN trong các tế bào này được khảo sát. Để so sánh, việc khảo sát giống như vậy cũng được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây (sau đây cũng được gọi là “dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1”). Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước với vai trò dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7. Dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị

trường được sử dụng là PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký) (Hologic, Inc.). Mặc dù thành phần cụ thể của PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký) không được công bố, nó được biết là dung dịch đệm chứa thành phần chính là metanol. Theo kết quả phân tích thành phần bằng cách sử dụng máy đo phổ phát xạ ICP (SII Nanotechnology Inc.), không phát hiện thấy ion kim loại có hóa trị hai trong PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký).

Bảng 1

Dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1	
Metanol	43% thể tích/thể tích
MgCl ₂	20mmol/L

1-2. Tế bào

Các tế bào được dùng để lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo sáng chế này là các dòng tế bào ung thư cổ người HeLa (được mua từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC - American Type Culture Collection)). Các tế bào HeLa được nuôi cấy trong môi trường Eagle được Dulbecco cải biến (DMEM: Sigma-Aldrich Co. LLC.) chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS: HyClone Laboratories, Inc.) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường khí chứa 5% CO₂.

2. Khảo sát độ ổn định lưu giữ ADN

2-1. Lưu giữ tế bào

Các tế bào HeLa trong môi trường nuôi cấy được thu gom bằng phương pháp thông thường và được tính toán. Các tế bào HeLa (1×10^6 tế bào) này được đưa vào 12mL dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 hoặc 12mL dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường chứa trong các ống nhựa thể tích 15mL (Labcon), và ngâm các tế bào này trong dung dịch bảo quản tế bào này. Các tế bào này được lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 1°C hoặc 31°C trong 2 tuần, 1 tháng, hoặc 2 tháng. Cần lưu ý rằng, trên thực tế lâm sàng, các tế bào nói chung thường được lưu giữ trong tủ lạnh (ở nhiệt độ khoảng 4°C). Nhiệt độ bằng “1°C” (tức là điều kiện nhiệt độ trong ví dụ này) là thấp hơn nhiệt độ trong tủ lạnh. Trong ví dụ này, thử nghiệm cũng được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong phòng (31°C) để xác định khả năng sử dụng dung dịch bảo quản tế bào này ở nhiệt độ trong phòng trên thực tế lâm sàng.

2-2. Tách ADN

Mẫu chứa các tế bào HeLa và chất bảo quản dung dịch được quay ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. ADN được tách từ các tế bào thu được bằng cách sử dụng bộ dụng cụ QIAamp DNA Mini Kit (do QIAGEN sản xuất). Các thao tác cụ thể được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng đi kèm với bộ kit. Mẫu tham chiếu là ADN được chiết theo cùng cách như được mô tả trên đây từ các tế bào HeLa đã được ngâm trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 hoặc dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường trong 3 giờ (sau đây cũng được gọi là “các tế bào ngay sau khi cố định”).

2-3. Điện di

Mức độ hấp phụ của mỗi dung dịch ADN được đo bằng cách sử dụng phổ quang kế (Nanodrop2000, do Thermo Fisher Scientific sản xuất) và thu được các nồng độ ADN. Chuẩn bị các mẫu để điện di trên gel agarosa từ các dung dịch ADN này sao cho lượng ADN chứa trong mỗi mẫu này bằng 500 ng/lần. Các mẫu thu được được đưa vào điện di trên gel agarosa 0,5%.

3. Kết quả

Fig. 1 thể hiện các kết quả của phép điện di. Như được thể hiện trên Fig. 1, khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, độ dài của trình tự nucleotit trong ADN thu được từ các tế bào sau khi lưu giữ một thời gian là ngắn hơn so với độ dài của trình tự trong ADN thu được từ các tế bào này ngay sau khi cố định. Điều đó chỉ ra rằng ADN này đã bị thoái hóa. Điều đó cũng cho thấy rằng, trong trường hợp sử dụng dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, ADN đã không được bảo trì một cách thích hợp trong thời gian lưu giữ. Do đó, có thể cho rằng trong trường hợp sử dụng dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, không thể thực hiện được việc phân tích ADN của các tế bào lưu giữ một cách thích hợp. Trong khi đó, khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1, độ dài của trình tự nucleotit trong ADN thu được từ các tế bào được lưu giữ ở điều kiện nhiệt độ bất kỳ trong thời gian lưu giữ bất kỳ là hầu như bằng với độ dài của trình tự nucleotit trong ADN thu được từ các tế bào này ngay sau khi cố định. Do đó, có thể cho rằng khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1, có thể thực hiện được việc phân tích ADN một cách thích hợp ngay và sau khi đã lưu giữ tế bào này trong một thời gian nhất định.

Ví dụ 2

Độ ổn định lưu giữ của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng cách lưu giữ các tế bào này trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 và sau đó phát hiện axit nucleic định trước trong ADN của các tế bào này (axit nucleic có nguồn gốc từ HPV). Để so sánh, PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký, Hologic, Inc.), tức là dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, được sử dụng để tiến hành cùng một khảo sát như vậy.

1. Khảo sát độ ổn định lưu giữ ADN trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường

1-1. Lưu giữ tế bào

Các tế bào cổ (tám mẫu) được tách từ cổ tử cung của tám đối tượng. Tám mẫu này được bổ sung tuần tự vào 12mL dung dịch PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký) và các tế bào này được ngâm trong dung dịch bảo quản tế bào này. Các mẫu này được chia thành ba phần bằng nhau để thu được các phần phân ước từ 1 đến 3. Phần phân ước 1 được đưa đi phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây, ngay sau khi được bổ sung vào dung dịch bảo quản tế bào này (ngay sau khi cố định). Phần phân ước 2 được đưa đi phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây sau khi lưu giữ ở nhiệt độ 1°C trong 1 tháng hoặc 2 tháng. Phần phân ước 3 được đưa đi phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây sau khi lưu giữ ở nhiệt độ 31°C trong 1 tháng hoặc 2 tháng. Ký hiệu của từng mẫu này và các điều kiện lưu giữ được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Ký hiệu mẫu	Các điều kiện lưu giữ		
	Phần phân ước 1	Phần phân ước 2	Phần phân ước 3
A4015	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4016	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4017	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 1 tháng	ở 31°C trong 1 tháng
A4019	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4020	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 1 tháng	ở 31°C trong 1 tháng

A4038	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4039	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4040	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng

1-2. Phát hiện axit nucleic

Trong Ví dụ 2, axit nucleic có nguồn gốc từ HPV lây nhiễm vào các tế bào cổ được phát hiện bằng phương pháp bắt giữ thể lai (HC). Trong bước xử lý sơ bộ của phương pháp HC, ADN của các tế bào này chứa trong từng phần phân ước được tách bằng cách sử dụng bộ kit chuyển hóa mẫu HC2 Sample Conversion Kit (Sản phẩm số 5127-1220, QIAGEN). Các thao tác cụ thể được thực hiện theo tờ hướng dẫn sử dụng đi kèm với bộ kit. Bộ kit phát hiện HPV-ADN (HPV DNA “QIAGEN” HCII (Sản phẩm số 618915, QIAGEN)) được sử dụng để phát hiện axit nucleic có nguồn gốc từ HPV trong ADN thu được từ từng phần phân ước nêu trên. Các thao tác cụ thể được thực hiện theo tờ hướng dẫn sử dụng đi kèm với bộ kit này.

1-3. Kết quả

Các kết quả thu được được thể hiện trên đồ thị ở Fig. 2A và 2B. Trong các Fig. này, trục tung là logarit của cường độ phát quang hóa học đo được bằng phương pháp HC (trị số HC2), “0 ngày” trên trục hoành chỉ thời điểm khi thời gian lưu giữ là 0 ngày (ngay sau khi cố định), và “1 tháng/2 tháng” chỉ thời điểm khi thời gian lưu giữ là 1 tháng hoặc 2 tháng. Như được thể hiện trên Fig. 2A, trị số HC2 của phần phân ước 2 có xu hướng giảm so với trị số HC2 của phần phân ước 1. Như được thể hiện trên Fig. 2B, trị số HC2 của phần phân ước 3 bị giảm so với trị số HC2 của phần phân ước 1. Các kết quả này cho thấy rằng khi các tế bào cổ tách từ đối tượng được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường ở 1°C hoặc 31°C trong 1 tháng hoặc trong 2 tháng, thì axit nucleic trong các tế bào này bị thoái hóa.

2. Khảo sát độ ổn định lưu giữ ADN trong dung dịch bảo quản tế bào theo phương án của sáng chế này

2-1. Lưu giữ tế bào

Các tế bào cổ (mười hai mẫu) được tách từ cổ tử cung của mười hai đối tượng khác với tám đối tượng nêu trên. Mười hai mẫu này được bổ sung tương ứng vào

12mL dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 và tiếp đó các tế bào này được ngâm trong dung dịch bảo quản tế bào này. Các mẫu này được chia thành ba phần bằng nhau để thu được các phần phân ước từ 1 đến 3. Các tế bào được thu gom từ phần phân ước 1, ngay sau khi được bổ sung vào dung dịch bảo quản tế bào (ngay sau khi cố định) và các tế bào thu được được lưu giữ ở -60°C . 2 tháng sau, tiến hành phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây trên các tế bào thu được từ phần phân ước 1 cũng như các tế bào từ các phần phân ước 2 và 3. Phần phân ước 2 được đưa đi phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây sau khi lưu giữ ở nhiệt độ 1°C trong 2 tháng. Phần phân ước 3 được đưa đi phát hiện axit nucleic như được mô tả dưới đây sau khi lưu giữ ở nhiệt độ 31°C trong 2 tháng. Ký hiệu của từng mẫu này và các điều kiện lưu giữ được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Ký hiệu mẫu	Các điều kiện lưu giữ		
	Phần phân ước 1	Phần phân ước 2	Phần phân ước 3
A4339	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4340	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4343	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4351	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4352	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4365	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
A4366	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
H-0072	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
H-0073	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
C-0113	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
C-0127	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng
C-0131	0 ngày (ngay sau khi cố định)	ở 1°C trong 2 tháng	ở 31°C trong 2 tháng

2-2. Phát hiện axit nucleic

Theo cùng cách như đã mô tả trên đây, axit nucleic có nguồn gốc từ HPV lây nhiễm vào tế bào cổ được phát hiện bằng phương pháp bắt giữ thể lai (HC). Việc xử lý sơ bộ theo phương pháp HC và việc phát hiện axit nucleic bằng phương pháp HC được tiến hành bằng cách sử dụng tương ứng các bộ kit chuyển hóa mẫu HC2 Sample Conversion Kit (QIAGEN) và HPV DNA “QIAGEN” HCII (QIAGEN). Các thao tác cụ thể được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng đi kèm theo mỗi bộ kit.

2-3. Kết quả

Các kết quả thu được được thể hiện trên đồ thị ở Fig. 3A và 3B. Trong các Fig. này, trục tung là cường độ phát quang hóa học đo được bằng phương pháp HC (trị số HC2), “0 ngày” trên trục hoành chỉ thời điểm khi thời gian lưu giữ là 0 ngày (ngay sau khi cố định), và “2 tháng” chỉ thời điểm khi thời gian lưu giữ là 2 tháng. Như được thể hiện trên Fig. 3A, trị số HC2 của phần phân ước 2 hầu như là tương đương với trị số HC2 của phần phân ước 1. Như được thể hiện trên Fig. 3B, trị số HC2 của phần phân ước 3 bị giảm so với trị số HC2 của phần phân ước 1. Các kết quả này cho thấy rằng ngay cả khi các tế bào cổ tách từ đối tượng được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 ở 1°C hoặc 31°C trong 2 tháng, thì axit nucleic trong các tế bào này vẫn có thể được bảo trì một cách thích hợp.

Ví dụ 3

Các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 được khảo sát để xác định độ thích hợp để nhuộm. Để so sánh, các tế bào lưu giữ trong dung dịch PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký, Hologic, Inc.), tức là dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, được sử dụng.

1. Nhuộm các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường

Các tế bào tách từ cổ tử cung của đối tượng được tạo huyền phù trong 20mL dung dịch PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký) và được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. Hệ thống chuẩn bị kính vật ThinPrep2000 (Hologic, Inc.) được sử dụng để tạo ra kính vật chứa có các tế bào từ dịch huyền phù tế bào bám dính trên đó. Các thao tác cụ thể được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng thiết bị. Kính vật thu được

được nhuộm bằng thuốc nhuộm Papanicolaou theo các bước được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Bước	Bể nhuộm	Thời gian
1	70% etanol	2 phút
2	50% etanol	2 phút
3	rửa bằng nước	2 phút
4	pha loãng 1,5 lần, Gill's Hematoxylin	4 phút
5	rửa bằng nước chảy	5 phút
6	0,2% axit clohydric rượu	1 phút
7	rửa bằng nước chảy	2 phút
8	70% etanol	2 phút
9	95% etanol	2 phút × 4 bể
10	OG6 (Orange G6)	2 phút
11	95% etanol	2 phút × 4 bể
12	EA (Eosin)	2 phút
13	100% etanol	2 phút × 4 bể
14	Xylen	5 phút × 4 bể

2. Nhuộm các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo phương án của sáng chế

Các tế bào tách từ cổ tử cung của đối tượng được tạo huyền phù trong 20mL dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 và được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. Sau đó, dịch huyền phù tế bào này được quay ly tâm ở 800 g trong 10 phút và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. 200 μ L nước đã khử ion được bổ sung vào phần kết tủa sao cho tạo ra được dịch huyền phù. Sau đó, tất cả huyền phù thu được được đưa vào ngăn chứa (BD Settling Chamber, Becton, Dickinson and Company) lắp trên kính vật (BD SurePath PreCoat Slide, Becton, Dickinson and Company) và được để yên trong 10 phút. Sau đó, các tế bào trên kính vật này được cố định bằng etanol 95% . Kính vật thu được được nhuộm bằng thuốc nhuộm Papanicolaou theo các bước được thể hiện trong Bảng 4 trên.

3. Kết quả

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 4. Như được thể hiện trên Fig. 4, khi các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này được nhuộm bằng thuốc nhuộm Papanicolaou, đã thu được hình vết nhuộm tương đương với hình của các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường.

Ví dụ 4

Mối tương quan giữa nồng độ ion magie trong dung dịch bảo quản tế bào và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trích lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Trong Ví dụ 4, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào có độ pH bằng 6,6.

Bảng 5

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 1	43	0
Dung dịch bảo quản tế bào 2	43	1,0
Dung dịch bảo quản tế bào 3	43	2,0
Dung dịch bảo quản tế bào 4	43	20

1-2. Tế bào

Các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào này là các dòng tế bào ung thư cổ người HeLa (được mua từ ATCC). Các tế bào HeLa này được nuôi cấy theo cùng cách như trong Ví dụ 1.

1-3. Chất phản ứng và lưu bào kế

Bộ hóa chất GC-SEARCH KIT (SYSMEX CORPORATION) được sử dụng làm dung dịch nhuộm hoặc chất loại bỏ ARN. Bộ hóa chất GC-PACK (SYSMEX CORPORATION) được sử dụng làm chất pha loãng. Thiết bị phân tích tế bào tróc vảy LC-1000 (SYSMEX CORPORATION) được sử dụng làm lưu bào kế.

2. Lưu giữ tế bào và phân tích trắc lưu tế bào (FCM)

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 1 tới 4. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 1°C hoặc 31°C trong 24 giờ. Mỗi thể huyền phù tế bào này được quay ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. 30 μ L dung dịch còn lại chứa các tế bào này được bổ sung 1mL of chất pha loãng. Hỗn hợp thu được được quay ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. Dung dịch nhuộm, chất loại bỏ ARN, và chất pha loãng được bổ sung vào 30 μ L dung dịch còn lại chứa các tế bào này để tạo ra mẫu đo. Mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, lập các biểu đồ phân bố tần suất (histogram), trong đó vùng phát huỳnh quang thu được từ mỗi tế bào này được biểu thị trên trục hoành và số lượng các tế bào được biểu thị trên trục tung. Cần lưu ý rằng vùng phát huỳnh quang là chỉ dấu phản ánh lượng ADN trong các tế bào.

3. Kết quả

Fig. 5 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập. Sau đây, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang này sẽ được mô tả. Đã biết rằng thường có hai đỉnh trong các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang này. Cụ thể, các đỉnh này gồm đỉnh được tạo ra từ quần thể các tế bào lưỡng bội và đỉnh được tạo ra từ quần thể các tế bào phát triển thành tế bào tứ bội. Lượng ADN trong các tế bào phát triển thành các tế bào tứ bội này là cao hơn so với lượng trong các tế bào lưỡng bội. Nói chung, đã biết rằng lượng ADN trong các tế bào lưỡng bội là bất biến. Do đó, khi ADN này ổn định, thì vùng phát huỳnh quang trong các tế bào lưỡng bội cũng không đổi, và vì vậy đỉnh của các tế bào lưỡng bội xuất hiện một cách sắc nhọn trong các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang. Trong khi đó, vùng phát huỳnh quang là chỉ dấu phản ánh lượng ADN. Do đó, khi sự mất ổn định của ADN làm cho nó bị thoái hóa hoặc

phân mảnh, thì lượng ADN trong các tế bào lưỡng bội sẽ kém bất biến hơn, từ đó gây ra sự thay đổi trong vùng phát huỳnh quang. Do đó, đỉnh của các tế bào lưỡng bội trên histogram sẽ kém nhọn hơn.

Như được thể hiện trên Fig. 5, cho dù các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bất kỳ trong số các dung dịch bảo quản tế bào từ 1 tới 4 trong điều kiện nhiệt độ bằng 1°C, dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn bình thường. Tuy nhiên, khi các tế bào này được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào 1, 2, và 3 có nồng độ ion kim loại hóa trị hai ở mức thấp ở 31°C, thì dạng histogram này bị phá vỡ. Trong khi đó, khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào 4 có nồng độ ion kim loại hóa trị hai bằng 20mmol/L, thì không thấy có sự phá vỡ hình dạng histogram ngay cả trong điều kiện nhiệt độ bằng 31°C. Từ đó, có thể thấy rằng khi nồng độ ion kim loại hóa trị hai này được chọn một cách thích hợp, thì ADN được duy trì một cách ổn định ngay cả khi được lưu giữ ở nhiệt độ cao, tương tự với khi được lưu giữ ở nhiệt độ thấp, và do vậy có thể ngăn ngừa sự phá vỡ histogram.

Ví dụ 5

Mối tương quan giữa nồng độ ion magie trong dung dịch bảo quản tế bào và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

Trong Ví dụ 5, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,6. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế này cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 6

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 5	43	0
Dung dịch bảo quản tế bào 6	43	1,0
Dung dịch bảo quản tế bào 7	43	2,0
Dung dịch bảo quản tế bào 8	43	3,0
Dung dịch bảo quản tế bào 9	43	4,0
Dung dịch bảo quản tế bào 10	43	5,0
Dung dịch bảo quản tế bào 11	43	6,0
Dung dịch bảo quản tế bào 12	43	8,0
Dung dịch bảo quản tế bào 13	43	10
Dung dịch bảo quản tế bào 14	43	20
Dung dịch bảo quản tế bào 15	43	30
Dung dịch bảo quản tế bào 16	43	40
Dung dịch bảo quản tế bào 17	43	60
Dung dịch bảo quản tế bào 18	43	80
Dung dịch bảo quản tế bào 19	43	82
Dung dịch bảo quản tế bào 20	43	85
Dung dịch bảo quản tế bào 21	43	90
Dung dịch bảo quản tế bào 22	43	92
Dung dịch bảo quản tế bào 23	43	95
Dung dịch bảo quản tế bào 24	43	100
Dung dịch bảo quản tế bào 25	43	120
Dung dịch bảo quản tế bào 26	43	200

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 5 tới 26. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 25°C trong 4 giờ hoặc ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu trữ và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Chỉ dấu về độ ổn định của hình dạng histogram được tính toán như sau. Cần lưu ý rằng việc tính toán này sẽ được mô tả bằng cách tham chiếu tới Fig.

6. Trên cơ sở histogram của các tế bào đã được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào 14 (với nồng độ MgCl_2 bằng 20mmol/L) ở 25°C trong 4 giờ, có thể tính được mode của vùng phát huỳnh quang trong miền tế bào lưỡng bội. Trị số mode này tương ứng với vị trí đỉnh như được chỉ ra bằng đầu mũi tên trên Fig. 6. Miền xuất hiện tế bào lưỡng bội được xác định như sau: mode của vùng phát huỳnh quang trong miền tế bào lưỡng bội có giới hạn dưới là 75% và mode của vùng phát huỳnh quang trong miền tế bào lưỡng bội có giới hạn trên là 125%. Trên Fig. 6, miền này tương ứng với miền nằm kẹp giữa hai đường thẳng. Hệ số biến thiên (CV) của vùng phát xạ huỳnh quang trong miền xuất hiện tế bào lưỡng bội được tính toán, và hệ số này được sử dụng làm chỉ dấu về độ ổn định của hình dạng histogram. Hệ số biến thiên (CV) lớn của vùng phát xạ huỳnh quang trong miền này chỉ ra rằng hình dạng histogram trong miền tế bào lưỡng bội bị phá vỡ.

3. Kết quả

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 7A và 7B. Như được thể hiện trên Fig. 7A, trong trường hợp lưu giữ ở 25°C trong 4 giờ, cho dù dung dịch nào trong số các dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ magie clorua nằm trong khoảng từ 0mmol/L tới 200mmol/L được sử dụng, trị số CV trong miền xuất hiện tế bào lưỡng bội đều thấp. Ngoài ra, khó thấy được sự thay đổi trị số CV theo nồng độ magie clorua. Trong khi đó, như được thể hiện trên Fig. 7A và 7B, trong trường hợp lưu giữ ở 30°C trong 24 giờ, trị số CV trong miền xuất hiện tế bào lưỡng bội đã tăng đáng kể khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào có nồng độ magie clorua cao hoặc thấp. Từ các kết quả này, có thể thấy rằng khi các dung dịch bảo quản tế bào từ 11 tới 19 được sử dụng, tức là khi nồng độ ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L, thì đã xuất hiện hiệu ứng ngăn ngừa sự phá vỡ hình dạng histogram. Như đã mô tả trên đây, vùng phát huỳnh quang là chỉ dấu phản ánh lượng ADN trong các tế bào. Do đó, khi sự mất ổn định của ADN làm cho nó bị thoái hóa hoặc phân mảnh, thì lượng ADN trong các tế bào lưỡng bội sẽ kém bất biến hơn, từ đó gây ra sự thay đổi trong vùng phát huỳnh quang. Do đó, hình dạng histogram trong miền tế bào lưỡng bội bị phá vỡ. Do đó, có thể cho rằng việc chọn nồng độ ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L có tác dụng ổn định ADN trong các tế bào.

Ví dụ 6

Mối tương quan giữa nồng độ rượu bậc thấp của dung dịch bảo quản tế bào này và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

Trong Ví dụ 6, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế này cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 7

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 27	40	10
Dung dịch bảo quản tế bào 28	40	20
Dung dịch bảo quản tế bào 29	40	40
Dung dịch bảo quản tế bào 30	45	10
Dung dịch bảo quản tế bào 31	45	20
Dung dịch bảo quản tế bào 32	45	40
Dung dịch bảo quản tế bào 33	38	10
Dung dịch bảo quản tế bào 34	38	20
Dung dịch bảo quản tế bào 35	38	40
Dung dịch bảo quản tế bào 36	38	60
Dung dịch bảo quản tế bào 37	48	10
Dung dịch bảo quản tế bào 38	48	20
Dung dịch bảo quản tế bào 39	48	40
Dung dịch bảo quản tế bào 40	48	60
Dung dịch bảo quản tế bào 41	35	20
Dung dịch bảo quản tế bào 42	35	40
Dung dịch bảo quản tế bào 43	43	20

Dung dịch bảo quản tế bào 44	43	40
Dung dịch bảo quản tế bào 45	50	20
Dung dịch bảo quản tế bào 46	50	40

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 27 tới 46. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Trên Fig. 8A, 8B, và 8C là các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 8A và 8B, khi nồng độ ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 10mmol/L tới 60mmol/L, thì với nồng độ metanol (MeOH) nằm trong khoảng từ 38% thể tích/thể tích tới 48% thể tích/thể tích, dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn được duy trì một cách khả quan. Như được thể hiện trên Fig. 8C, khi nồng độ ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này bằng 20mmol/L hoặc 40mmol/L, thì cho dù nồng độ metanol là 35% thể tích/thể tích hay 50% thể tích/thể tích, dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn được duy trì một cách khả quan.

Ví dụ 7

Mối tương quan giữa độ pH của dung dịch bảo quản tế bào và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trích lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

Trong Ví dụ 7, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 8 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao

cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào từ 47 tới 50 có độ pH bằng 6,4 và mỗi dung dịch bảo quản tế bào từ 51 tới 54 có độ pH bằng 7,0. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế này cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 8

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 47	43	10
Dung dịch bảo quản tế bào 48	43	20
Dung dịch bảo quản tế bào 49	43	40
Dung dịch bảo quản tế bào 50	43	60
Dung dịch bảo quản tế bào 51	43	10
Dung dịch bảo quản tế bào 52	43	20
Dung dịch bảo quản tế bào 53	43	40
Dung dịch bảo quản tế bào 54	43	60

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 47 to 54. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 9 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 9, khi nồng độ ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 10mmol/L tới 60mmol/L, thì cho dù độ pH là 6,4 hay 7,0, dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn được duy trì một cách khả quan.

Ví dụ 8

Mối tương quan giữa nồng độ ion canxi trong dung dịch bảo quản tế bào và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào trong đó ion canxi được sử dụng làm ion kim loại hóa trị hai.

1. Nguyên vật liệu

Trong Ví dụ 8, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và canxi clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế này cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 9

	Metanol (% thể tích/thể tích)	CaCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 55	43	0
Dung dịch bảo quản tế bào 56	43	1,0
Dung dịch bảo quản tế bào 57	43	20

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 55 tới 57. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 1°C hoặc 31°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 10 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 10, cho dù các tế bào được lưu giữ trong dung dịch nào trong số các dung dịch bảo quản tế bào từ 55 tới 57 trong điều kiện nhiệt độ bằng 1°C, thì dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn bình thường. Tuy nhiên, khi các tế bào được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào 55 và 56 có nồng độ ion kim loại hóa trị hai ở mức thấp ở nhiệt độ 31°C, thì dạng histogram này bị phá vỡ. Trong khi đó, khi dung dịch bảo quản tế bào 57 có nồng độ ion kim loại hóa trị hai bằng 20mmol/L được sử dụng, thì không thấy có sự phá vỡ hình dạng histogram cho dù ở điều kiện nhiệt độ 31°C. Do đó, có thể thấy rằng, bằng cách chọn nồng độ ion kim loại hóa trị hai một cách thích hợp, có thể duy trì được ADN một cách ổn định ngay cả khi lưu giữ ở nhiệt độ cao, tương tự với khi lưu giữ ở nhiệt độ thấp, và do vậy có thể ngăn ngừa sự phá vỡ histogram.

Ví dụ đối chứng 1

Đối với các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường, độ ổn định của ADN cũng được khảo sát bằng phương pháp trích lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

Trong Ví dụ đối chứng 1, chế phẩm PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký, Hologic, Inc.) được sử dụng làm dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được dùng cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù trong chế phẩm PreservCyt (nhãn hiệu đã được đăng ký). Dịch huyền phù tế bào thu được được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, ở 31°C trong 24 giờ, hoặc ở 31°C trong 7 ngày. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 11 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 11, trong trường hợp lưu giữ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, hình dạng histogram trong vùng phát huỳnh quang vẫn bình thường. Tuy nhiên, trong trường hợp lưu giữ ở 31°C trong 24 giờ hoặc 7 ngày, dạng histogram này bị phá vỡ. Do đó, có thể thấy rằng dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường khác với dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này và không thích hợp để lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 31°C.

Ví dụ 9

Mối tương quan giữa nồng độ ion canxi trong dung dịch bảo quản tế bào và độ ổn định của ADN trong các tế bào được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Trong Ví dụ 9, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và canxi clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,6. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được dùng cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 10

	Metanol (% thể tích/thể tích)	CaCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 58	43	0
Dung dịch bảo quản tế bào 59	43	1,0
Dung dịch bảo quản tế bào 60	43	6,0
Dung dịch bảo quản tế bào 61	43	20
Dung dịch bảo quản tế bào 62	43	82
Dung dịch bảo quản tế bào 63	43	100
Dung dịch bảo quản tế bào 64	43	200

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 58 tới 64. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 13 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 13, khi các tế bào được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào 60, 61, và 62 có các nồng độ ion canxi tương ứng bằng 6, 20, và 82mmol/L, ở nhiệt độ 30°C, thì các dạng histogram vẫn khả quan. Như đã mô tả trên đây, vùng phát xạ huỳnh quang là chỉ dấu phản ánh lượng ADN trong các tế bào. Do đó, việc dạng histogram của vùng phát xạ huỳnh quang vẫn khả quan có nghĩa là ADN trong các tế bào đã được duy trì một cách ổn định trong thời gian lưu giữ. Do đó, có thể thấy rằng, bằng cách chọn nồng độ ion canxi thích hợp, ADN trong các tế bào có thể được duy trì một cách ổn định ngay cả khi được lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 30°C.

Ví dụ 10

Các tế bào được cố định và lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào chứa ion kim loại có hóa trị hai là cả ion magie lẫn ion canxi. Độ ổn định của ADN trong các tế bào lưu giữ được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào. Để so sánh, dung dịch bảo quản tế bào không chứa ion kim loại có hóa trị hai cũng được sử dụng.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Trong Ví dụ 10, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) và canxi clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng

20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế này cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 11

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)	CaCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 65	43	0	0
Dung dịch bảo quản tế bào 66	43	10	10

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào 65 và 66. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 14 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 14, khi các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào 65 không chứa ion kim loại hóa trị hai ở 30°C, thì hình dạng histogram bị phá vỡ. Trong khi đó, khi sử dụng dung dịch bảo quản tế bào 66 có tổng nồng độ của các ion kim loại hóa trị hai bằng 20mmol/L, thì hình dạng histogram rất khả quan. Do đó, có thể thấy rằng, bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào chứa hai loại ion kim loại hóa trị hai ở nồng độ thích hợp, thì ADN trong các tế bào có thể được duy trì một cách ổn định ngay cả khi được lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 30°C.

Ví dụ 11

Các tế bào được cố định và lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào chứa rượu bậc thấp là etanol. Độ ổn định của ADN trong các tế bào lưu giữ được khảo sát bằng phương pháp trích lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Trong Ví dụ 11, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 12 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được dùng cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Bảng 12

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 67	30	20

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù trong dung dịch bảo quản tế bào 67. Dịch huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 7 ngày. Mẫu đo được điều chế từ dịch huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 15 thể hiện biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 15, khi các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào 67 rượu bậc thấp chứa là etanol, thì hình dạng histogram rất khả quan. Do đó, có thể cho rằng, bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào chứa etanol và ion kim loại hóa trị hai ở nồng độ thích hợp, ADN trong các tế bào có thể được duy trì một cách ổn định ngay cả khi được lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 30°C.

Ví dụ đối chứng 2

Độ ổn định của ADN trong các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này được so sánh với độ ổn định của ADN trong các

tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào đã được mô tả trong Ví dụ 5 của Tài liệu sáng chế 1 (patent Mỹ số 5,256,571).

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này được sử dụng là dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1. Ngoài ra, dung dịch bảo quản tế bào đã được mô tả trong Ví dụ 5 của Tài liệu sáng chế 1 (sau đây cũng được gọi là “dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ đối chứng 2”) là dung dịch bảo quản tế bào được điều chế theo cách sao cho có được thành phần như được nêu dưới đây. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được dùng cũng chính là các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

Dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ đối chứng 2:

1 mM magie axetat hexahydrat

2 mM canxi axetat monohydrat

10 mM kali clorua

0,1% natri clorua

20% metanol

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HeLa được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 và dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ đối chứng 2. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 7 ngày. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 16 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 16, khi các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1 ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày, thì hình dạng histogram trong vùng phát

huỳnh quang vẫn bình thường. Trong khi đó, khi các tế bào được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ đối chứng 2, thì hình dạng histogram bị phá vỡ. Do đó, có thể thấy rằng dung dịch bảo quản tế bào đã được mô tả trong Ví dụ 5 của patent Mỹ số 5,256,571 là khác với dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này và không thích hợp để lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 30°C.

Ví dụ 12

Các tế bào có nguồn gốc từ mô bình thường được cố định và lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào chứa ion magie. Độ ổn định của ADN trong các tế bào lưu giữ được khảo sát bằng phương pháp trắc lưu tế bào.

1. Nguyên vật liệu

1-1. Dung dịch bảo quản tế bào

Trong Ví dụ 12, các dung dịch bảo quản tế bào được điều chế bằng cách trộn metanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) và magie clorua (Kishida Chemical Co., Ltd.) sao cho thu được dung dịch với thành phần như được thể hiện trong Bảng 13 dưới đây. Trong điều chế dung dịch bảo quản tế bào này, nước được sử dụng làm dung môi và PIPES (DOJINDO LABORATORIES) với vai trò chất đệm được bổ sung sao cho thu được nồng độ bằng 20 mM. Dung dịch NaOH trong nước được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Mỗi dung dịch bảo quản tế bào này có độ pH bằng 6,7.

Bảng 13

	Metanol (% thể tích/thể tích)	MgCl ₂ (mmol/L)
Dung dịch bảo quản tế bào 68	43	0
Dung dịch bảo quản tế bào 69	43	6
Dung dịch bảo quản tế bào 70	43	20
Dung dịch bảo quản tế bào 71	43	82

1-2. Các tế bào, chất phản ứng và lưu bào kế

Các tế bào có nguồn gốc từ mô bình thường cần được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào theo sáng chế này là dòng tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người HUVEC (được mua từ ATCC). Các tế bào HUVEC này được nuôi cấy theo cùng cách như nuôi cấy các tế bào HeLa của Ví dụ 1. Chất phản ứng và lưu bào kế được dùng cũng chính là chất phản ứng và lưu bào kế được sử dụng trong Ví dụ 4.

2. Lưu giữ tế bào và phân tích FCM

Các tế bào HUVEC được đưa vào và tạo huyền phù lần lượt trong các dung dịch bảo quản tế bào từ 68 tới 71. Thể huyền phù tế bào thu được được để yên ở 30°C trong 24 giờ. Các mẫu đo được tạo ra từ thể huyền phù tế bào này theo cùng cách như trong Ví dụ 4. Từng mẫu đo thu được được đưa vào lưu bào kế và thu lại các tín hiệu quang học (tín hiệu phát xạ huỳnh quang và tín hiệu ánh sáng tán xạ thẳng). Sau đó, các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang được lập theo cùng cách như trong Ví dụ 4.

3. Kết quả

Fig. 17 thể hiện các biểu đồ tần suất vùng phát xạ huỳnh quang thu được. Như được thể hiện trên Fig. 17, khi các tế bào HUVEC được lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào 68 không chứa ion magie ở nhiệt độ 30°C, thì hình dạng histogram bị phá vỡ. Trong khi đó, khi các tế bào này được lưu giữ trong các dung dịch bảo quản tế bào 69, 70, và 71 có các nồng độ ion magie tương ứng bằng 6, 20, và 82mmol/L ở nhiệt độ 30°C, thì dạng histogram rất khả quan. Do vậy, có thể thấy rằng, bằng cách sử dụng dung dịch bảo quản tế bào theo một phương án của sáng chế này, thì ngay cả khi các tế bào có nguồn gốc từ mô bình thường được lưu giữ trong điều kiện nhiệt độ bằng 30°C, ADN trong các tế bào này vẫn có thể được duy trì một cách ổn định.

Danh sách ký hiệu tham chiếu

11: Lọ chứa dung dịch bảo quản tế bào

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bảo quản tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước ngâm các tế bào này *in vitro* trong dung dịch bảo quản tế bào, khác biệt ở chỗ dung dịch bảo quản tế bào này chứa rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ion kim loại hóa trị hai là ion kim loại của nguyên tố thuộc Nhóm II.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ion kim loại hóa trị hai là ít nhất một ion được chọn từ ion magie và ion canxi.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 80mmol/L.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai nằm trong khoảng từ 10mmol/L tới 60mmol/L.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó rượu bậc thấp là ít nhất một rượu được chọn từ metanol và etanol.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó nồng độ của rượu bậc thấp nằm trong khoảng từ 20% tính theo thể tích tới 60% tính theo thể tích.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó độ pH nằm trong khoảng từ 6 tới 8.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào này là các tế bào cổ, tế bào bên trong thân tử cung, tế bào vùng miệng, tế bào tuyến vú, tế bào tuyến giáp, tế bào trong nước tiểu, tế bào trong nước dãi, tế bào thu được bằng phương pháp chải phết quản, tế bào trong dịch rửa màng bụng, hoặc tế bào trong dịch thể khoang, là các tế bào được tách ra từ cơ thể sống, hoặc là các tế bào chứa trong trong mô được tách ra.
10. Phương pháp sản xuất dung dịch bảo quản tế bào, bao gồm bước trộn rượu bậc thấp có từ 1 tới 6 nguyên tử cacbon và ion kim loại hóa trị hai trong dung môi nước, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai trong dung dịch bảo quản tế bào này nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 82mmol/L.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó ion kim loại hóa trị hai là ion kim loại của nguyên tố thuộc Nhóm II.
12. Phương pháp theo điểm 10 hoặc 11, trong đó ion kim loại hóa trị hai là ít nhất một ion được chọn từ ion magie và ion canxi.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai nằm trong khoảng từ 6mmol/L tới 80mmol/L.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó nồng độ của ion kim loại hóa trị hai nằm trong khoảng từ 10mmol/L tới 60mmol/L.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 14, trong đó rượu bậc thấp là ít nhất một rượu được chọn từ metanol và etanol.
16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 15, trong đó nồng độ của rượu bậc thấp trong dung dịch bảo quản tế bào nằm trong khoảng từ 20% tính theo thể tích tới 60% tính theo thể tích.
17. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 16, trong đó dung dịch bảo quản tế bào có pH nằm trong khoảng từ 6 tới 8.
18. Phương pháp thu nhận tế bào cố định, bao gồm bước cho tế bào này tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 để làm cho các tế bào này được cố định.
19. Phương pháp phân tích tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: cho tế bào này tiếp xúc *in vitro* với dung dịch bảo quản tế bào như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 để làm cho tế bào này được cố định; và phân tích axit nucleic trong tế bào đã được cố định trong bước trước đó.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thông tin về lượng axit nucleic trong các tế bào đã được cố định được thu nhận trong bước phân tích.
21. Phương pháp theo điểm 19 hoặc 20, còn bao gồm bước nhuộm các axit nucleic trong các tế bào đã được cố định giữa bước cố định và bước phân tích, trong đó bước phân tích này bao gồm các bước sau: đưa các tế bào đã được nhuộm vào lưu bào kế và thu nhận thông tin quang học từ các tế bào này; và phân tích axit nucleic trên cơ sở thông tin quang học thu được.

22. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 21, trong đó bước phân tích còn bao gồm bước phát hiện axit nucleic định trước trong các tế bào đã được cố định.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó các tế bào này là các tế bào được tách từ cổ tử cung và axit nucleic định trước là axit nucleic có nguồn gốc từ virus u nhú ở người (HPV).

24. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 hoặc 8 đến 23, trong đó các tế bào lưu giữ trong dung dịch bảo quản tế bào này là các tế bào cổ, tế bào bên trong thân tử cung, tế bào vùng miệng, tế bào tuyến vú, tế bào tuyến giáp, tế bào trong nước tiểu, tế bào trong nước dãi, tế bào thu được bằng phương pháp chải phế quản, tế bào trong dịch rửa màng bụng, hoặc tế bào trong dịch thể khoang, là các tế bào được tách ra từ cơ thể sống, hoặc là các tế bào chứa trong mô được tách ra.

Fig. 1

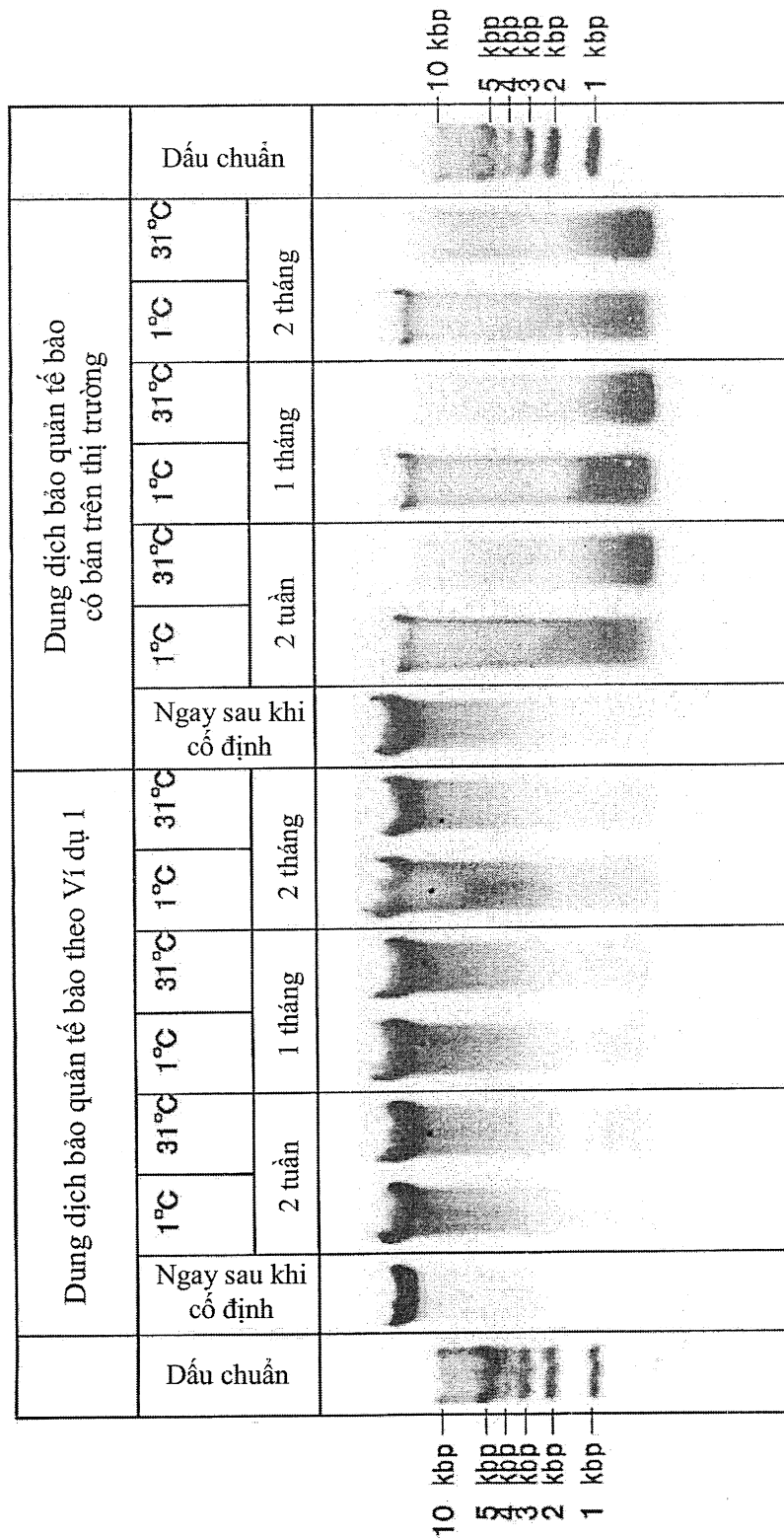


Fig. 2A

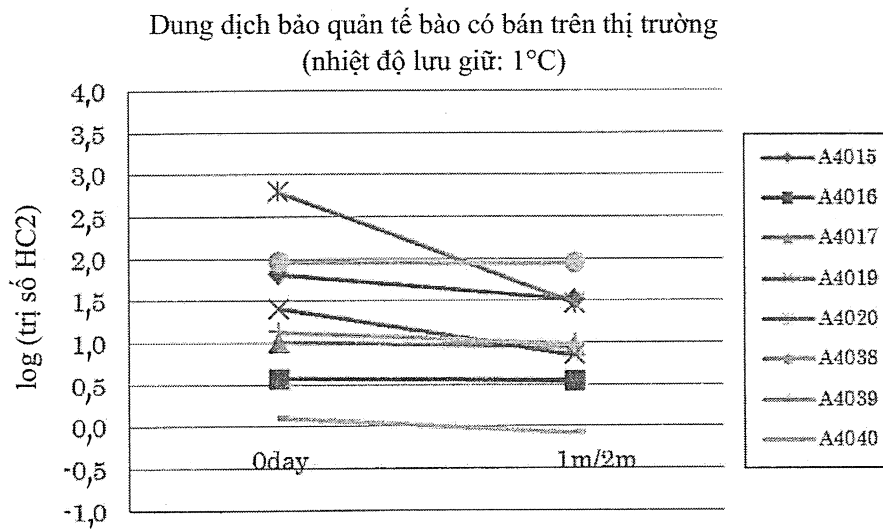


Fig.2B

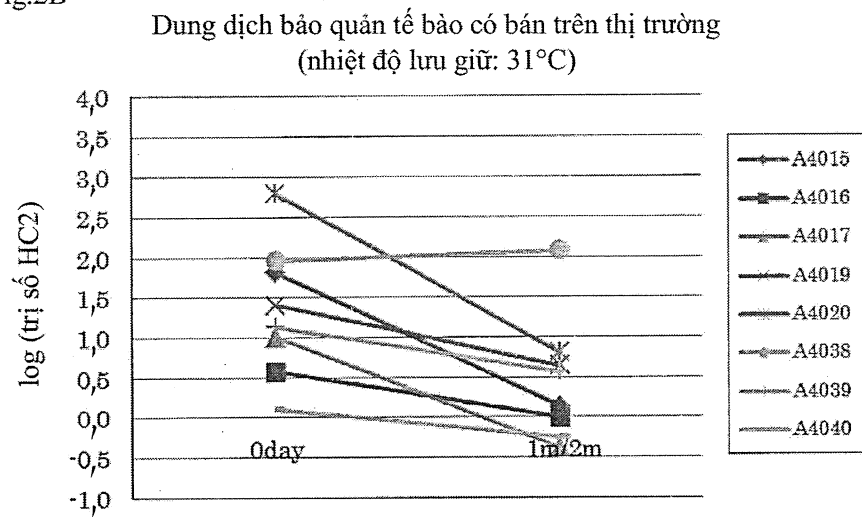


Fig. 3A

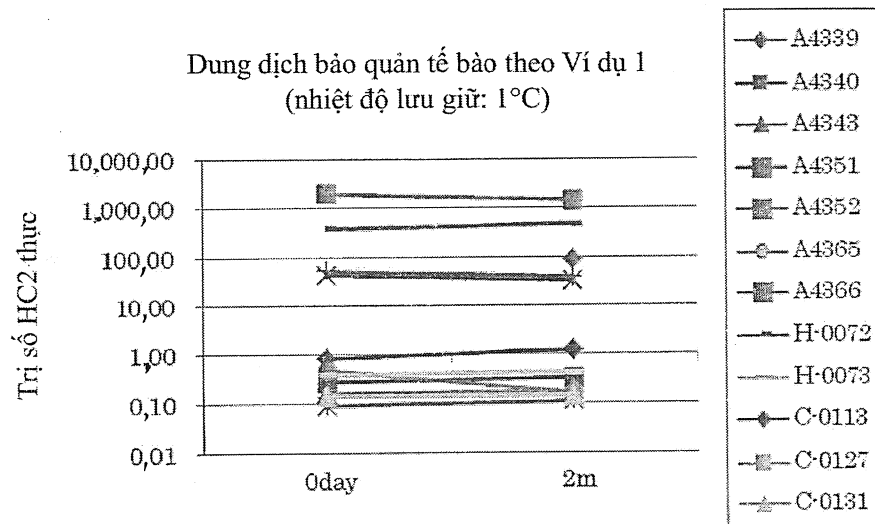


Fig. 3B

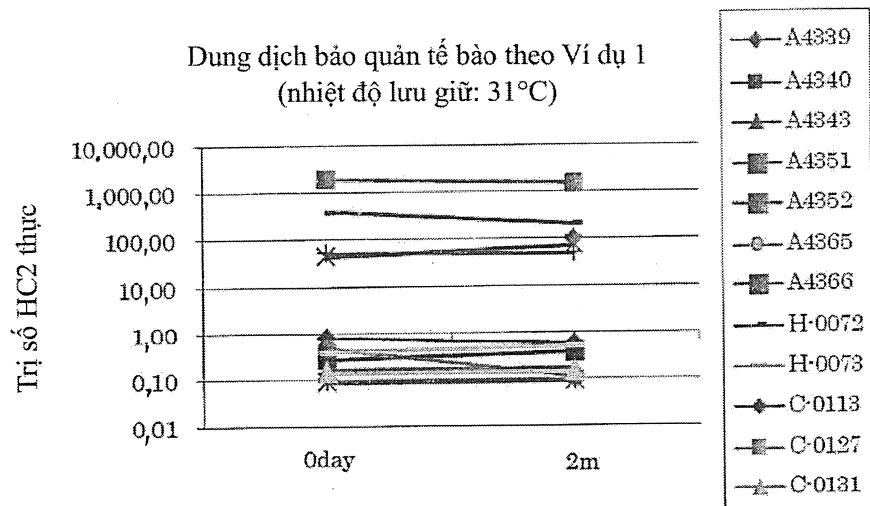


Fig. 4

Dung dịch bảo quản tế bào theo Ví dụ 1



Dung dịch bảo quản tế bào có bán trên thị trường

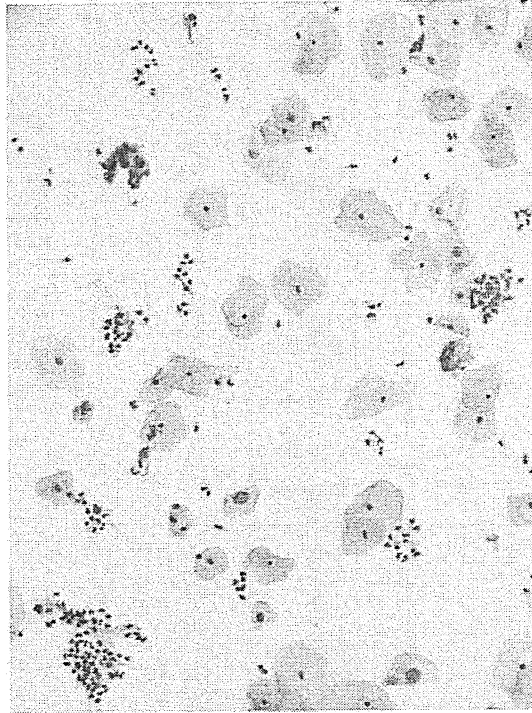


Fig. 5

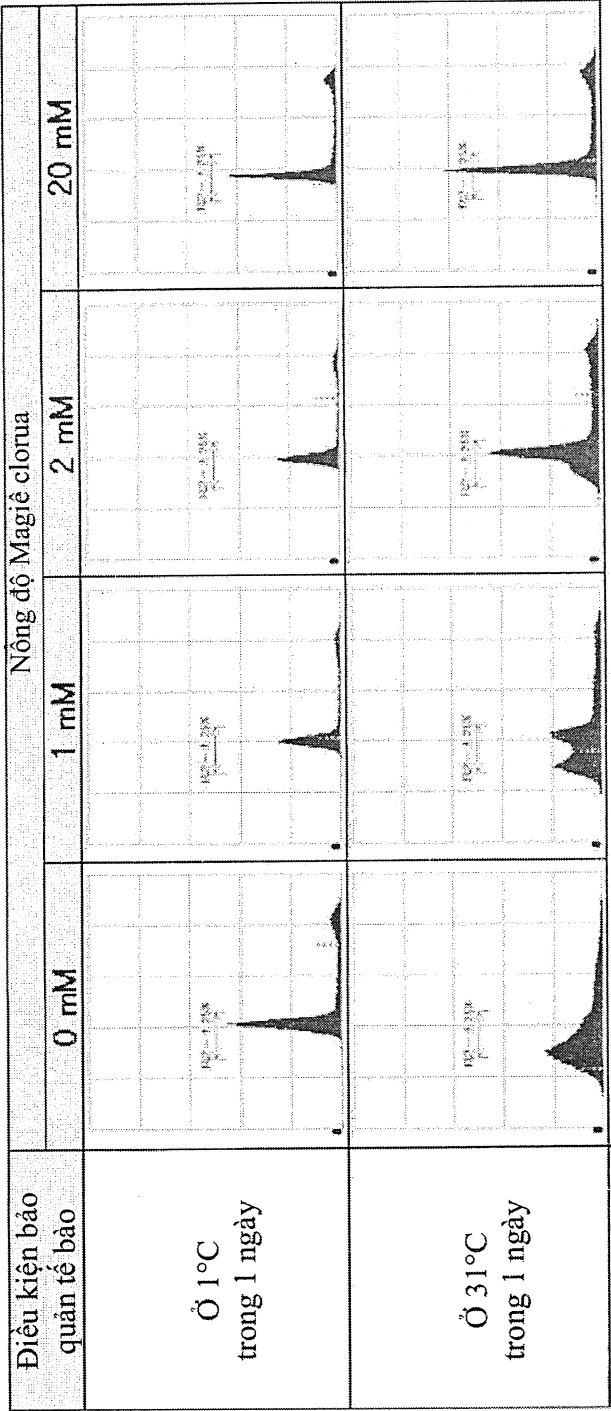


Fig. 6

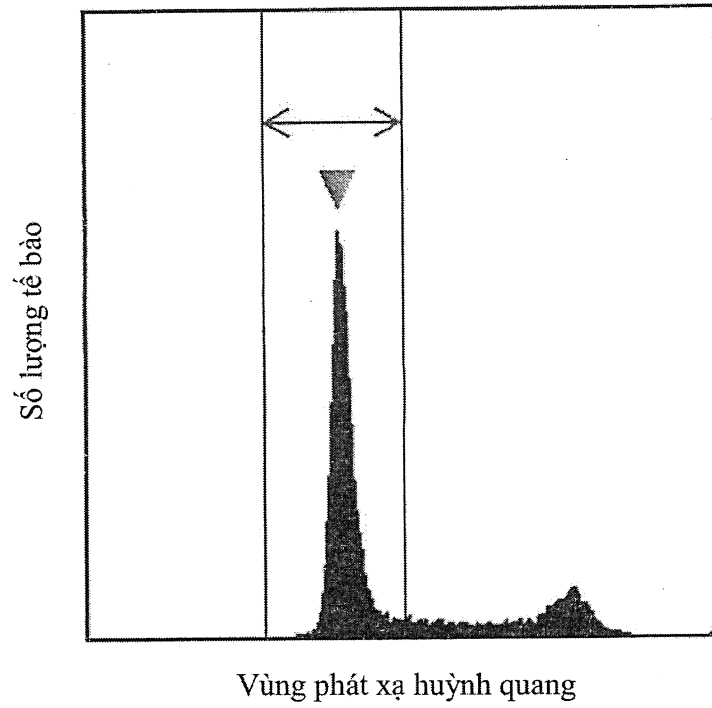


Fig. 7A

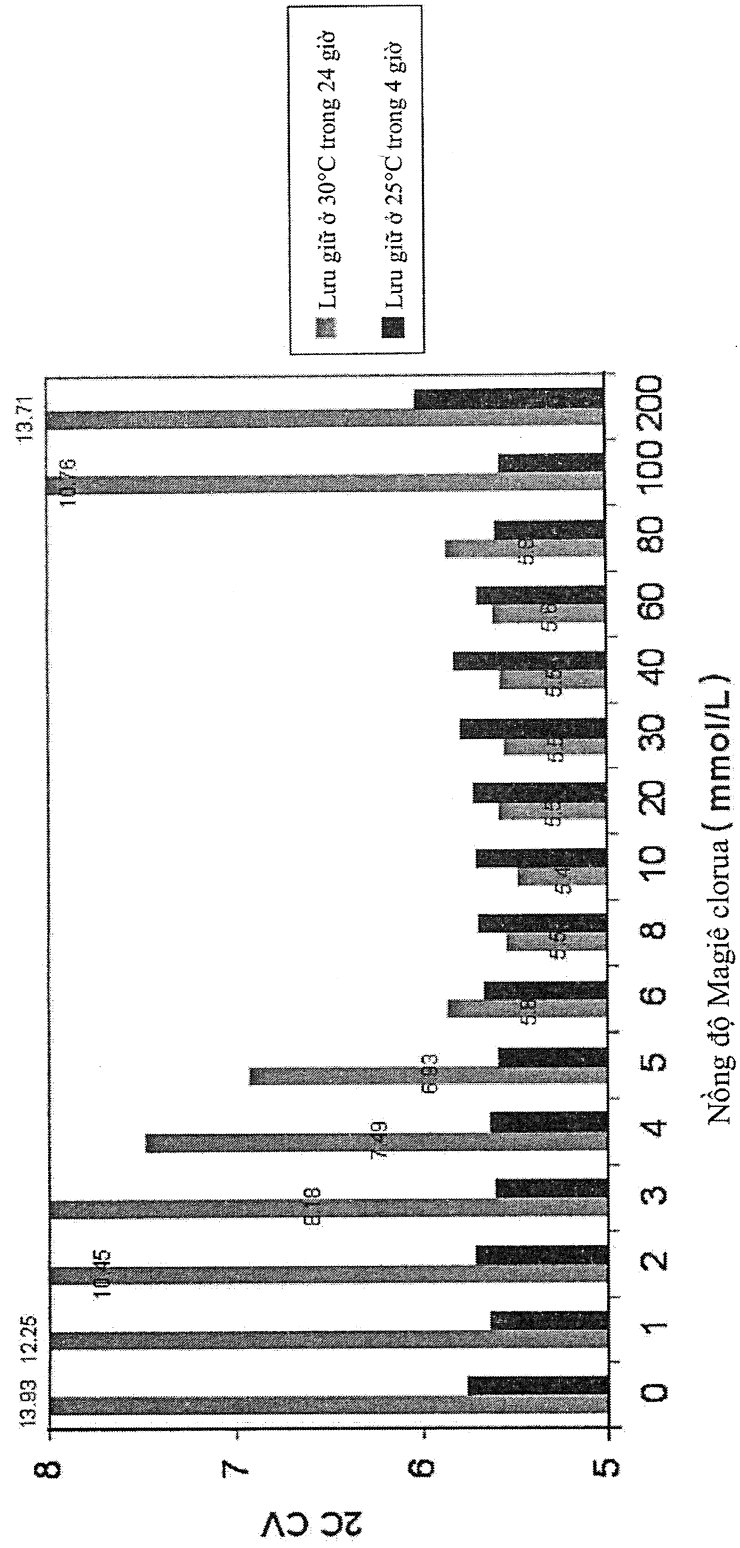


Fig. 7B

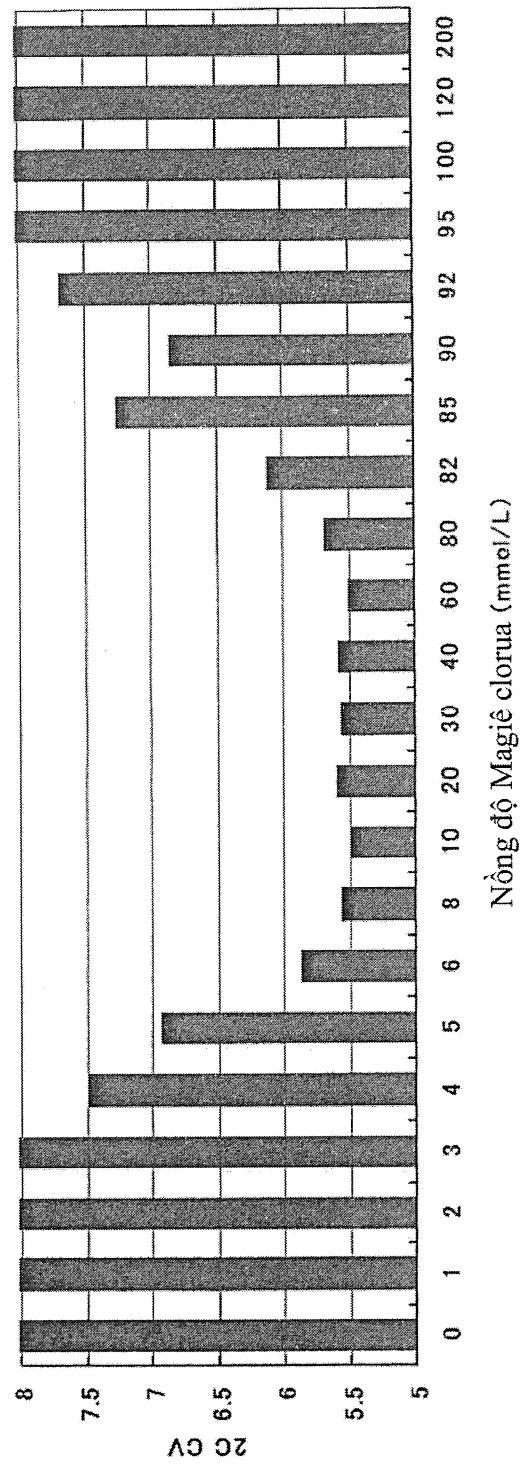


Fig. 8A

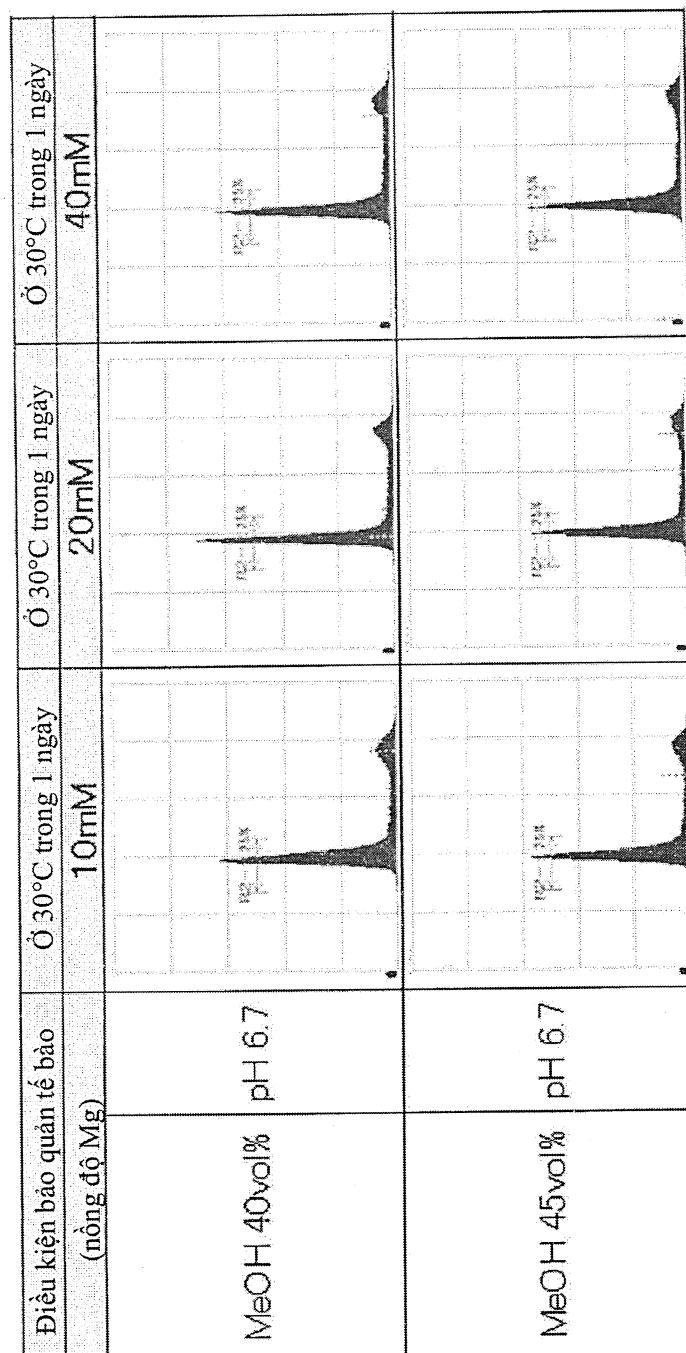


Fig. 8B

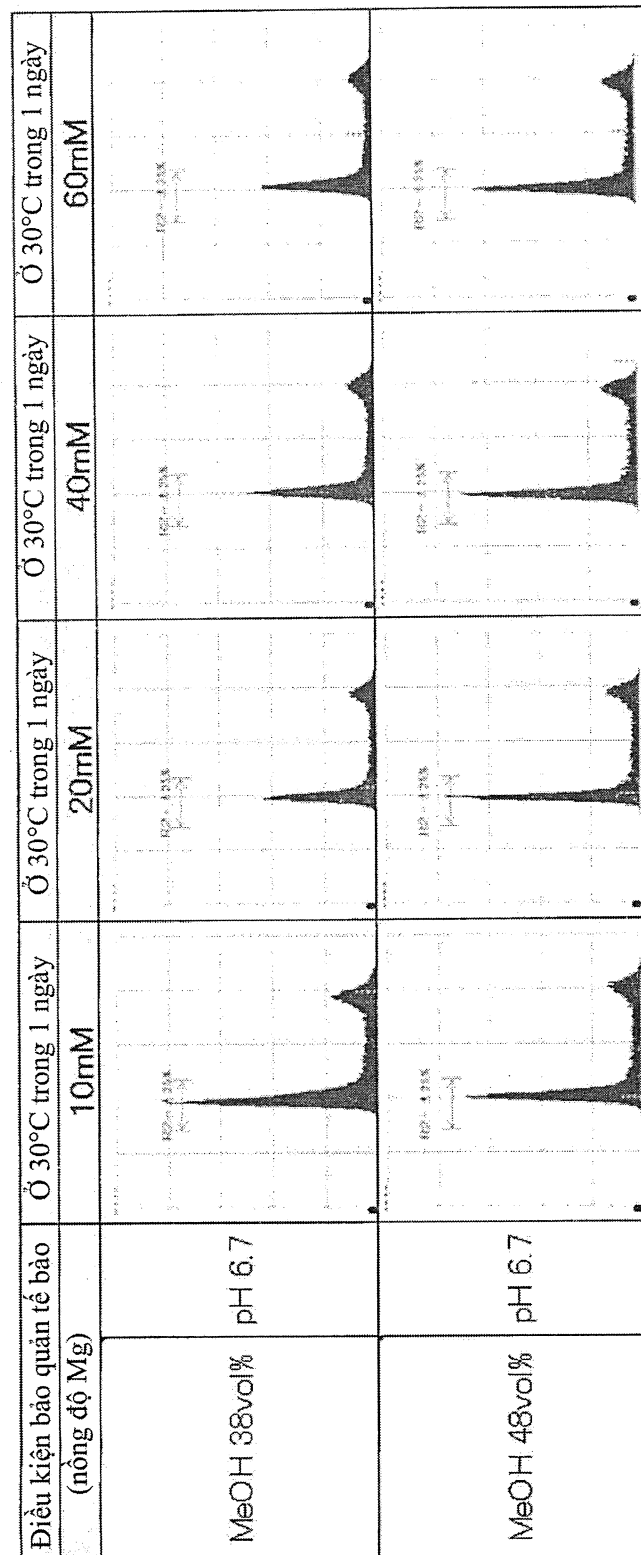


Fig. 8C

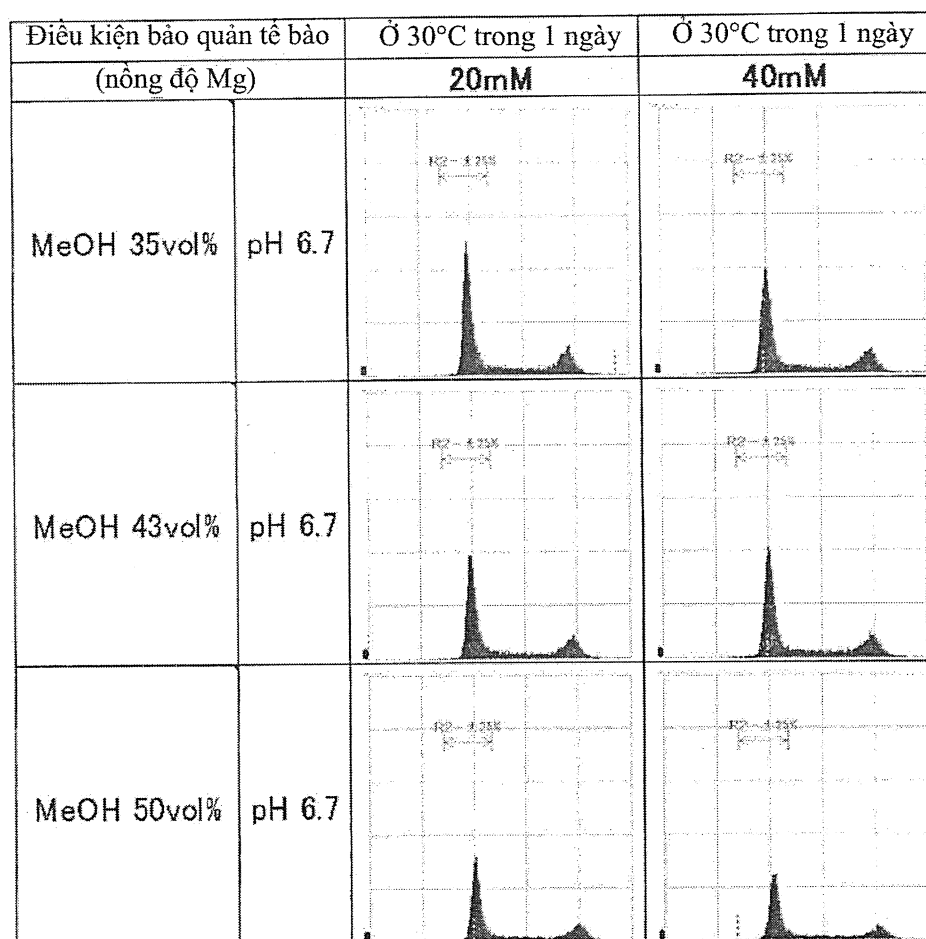


Fig. 9

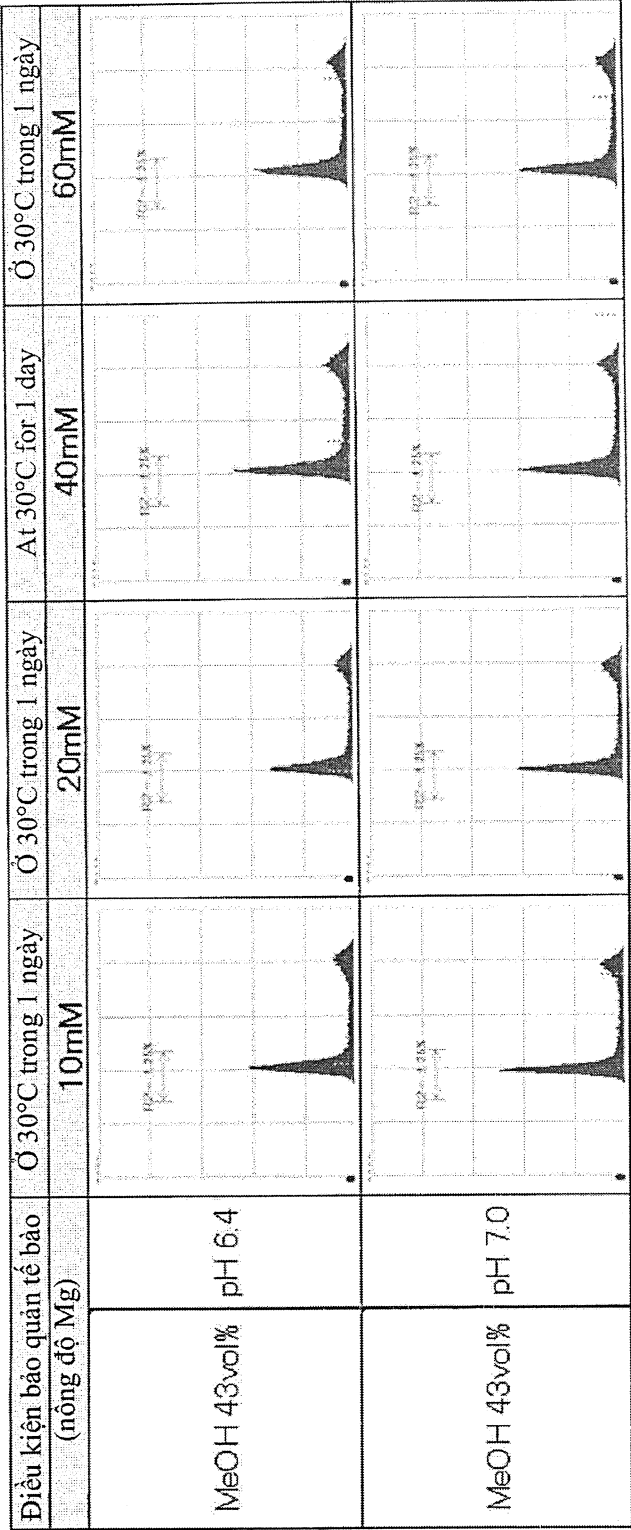


Fig. 10

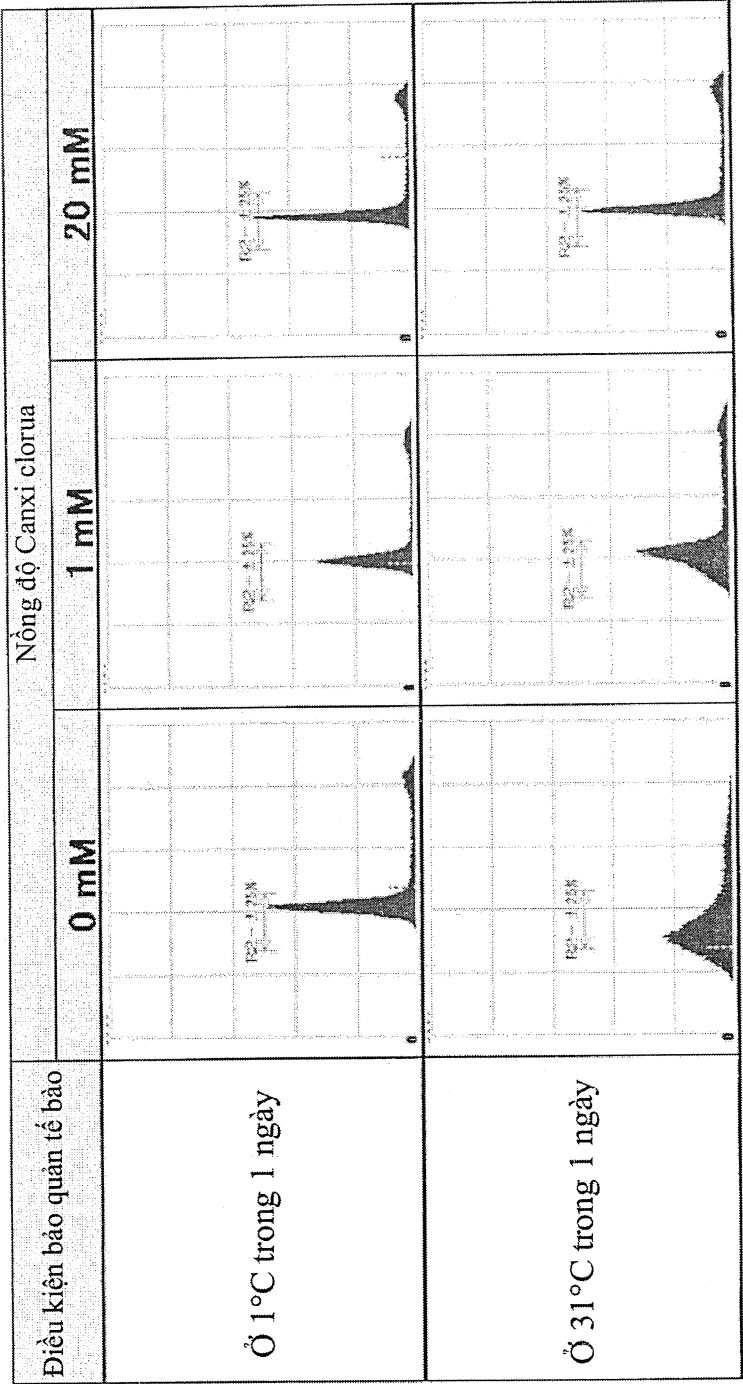


Fig. 11

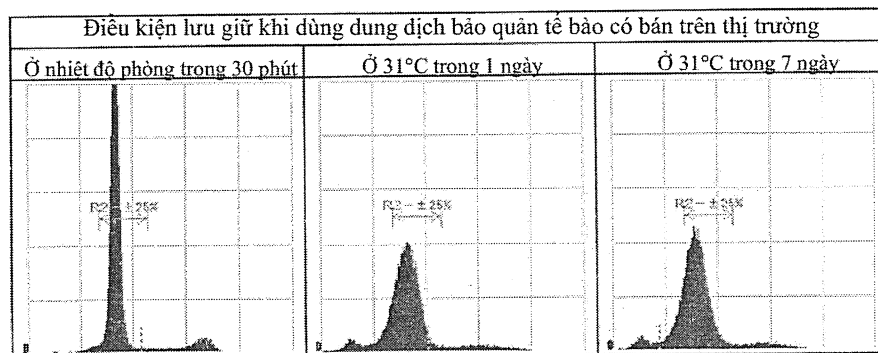


Fig. 12



Fig. 13

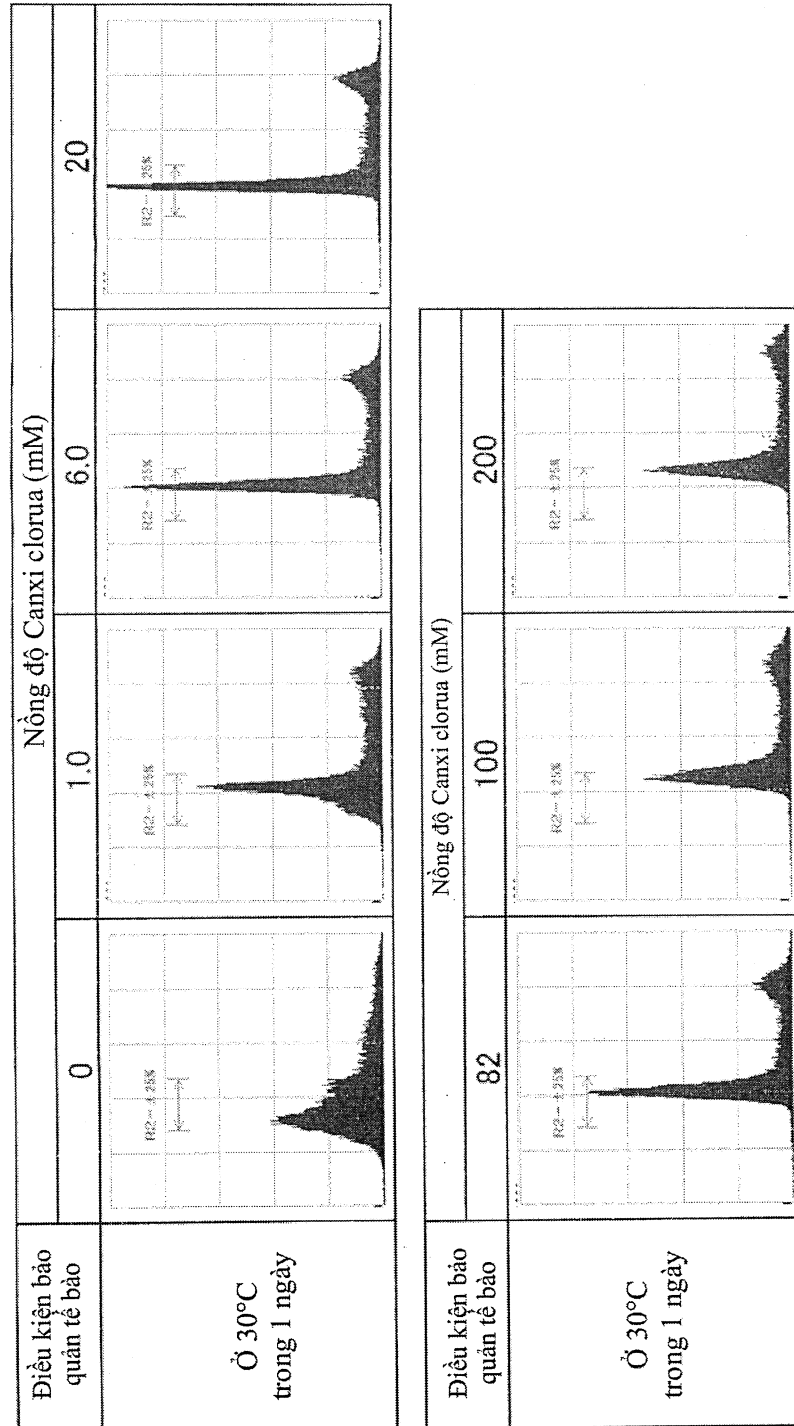


Fig. 14

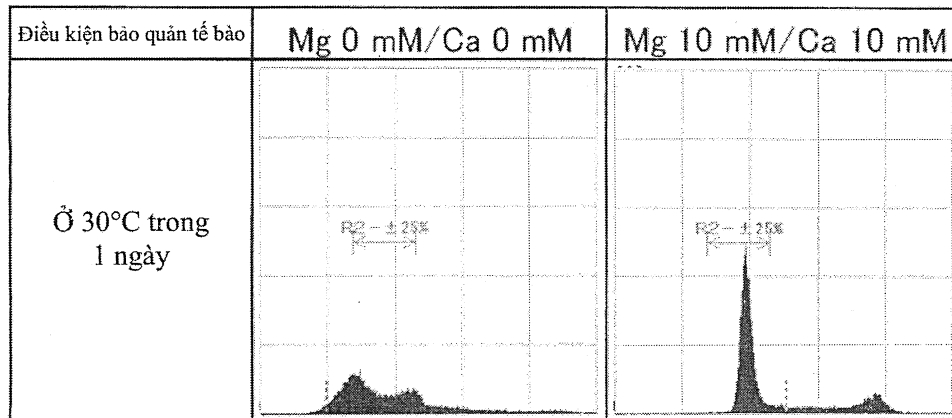


Fig. 15

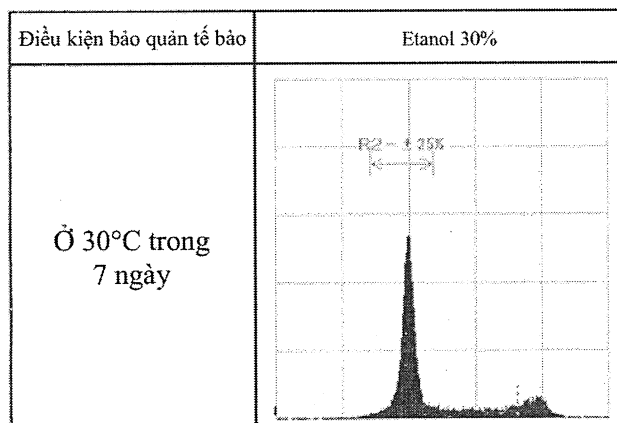


Fig. 16

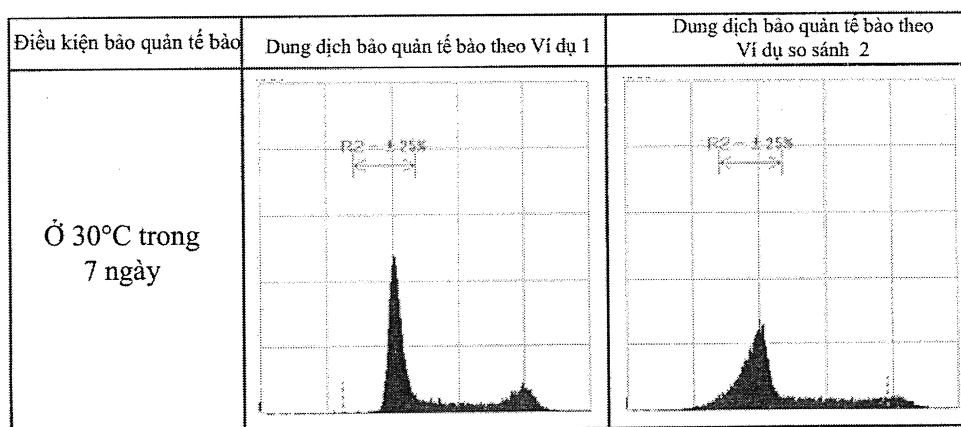


Fig. 17

