



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

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

(11) 
2-0001764

(51)⁷ **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00235

(22) 01.07.2016

(45) 25.07.2018 364

(43) 26.09.2016 342

(73) 1. NGUYỄN THỊ TRANG (VN)
Thôn 10, Phù Lưu Tế, Mỹ Đức, Hà Nội

2. THÂN THỊ THÙY LINH (VN)
Trí Yên, Yên Dũng, Bắc Giang

(72) Nguyễn Thị Trang (VN), Thân Thị Thùy Linh (VN), Trần Thị Oanh (VN), Trần Đức Phấn (VN), Lương Thị Lan Anh (VN), Triệu Tiến Sang (VN), Nguyễn Minh Tuấn Anh (VN)

(54) **QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ PHÂN MẢNH ADN CỦA TINH TRÙNG VÀ
KIT DÙNG CHO QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng và kit dùng cho quy trình này. Quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) chuẩn bị tiêu bản, b) biến tính ADN của tinh trùng, c) ly giải màng nhân tế bào tinh trùng, d) nhuộm tiêu bản; và e) xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng. Theo đó, quy trình theo giải pháp tối ưu điều kiện cố định mẫu, điều kiện ly giải màng nhân và điều kiện nhuộm giúp giảm được hóa chất phá vỡ màng nhân và sử dụng loại thuốc nhuộm thông thường mà vẫn thu được hiệu quả tương đương loại thuốc nhuộm đặc hiệu. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến kit dùng cho quy trình xác định mức độ phân mảnh của tinh trùng theo giải pháp hữu ích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực di truyền ứng dụng trong y học, cụ thể là đề cập đến quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng và kit dùng cho quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Có rất nhiều nguyên nhân gây ra vô sinh nam, một trong những nguyên nhân gây ra vô sinh nam là do sự phân mảnh ADN của tế bào tinh trùng. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, mặc dù nhiều trường hợp chỉ số tinh dịch đồ ở ngưỡng bình thường, nhưng vẫn bị vô sinh. Điều này là do các chỉ số tinh dịch đồ không đánh giá hết được hoàn toàn về mặt hình thái và chức năng của tinh trùng.

Phân mảnh ADN của tinh trùng là một trong những rối loạn vật chất di truyền dẫn tới khả năng thụ tinh kém, thai kém phát triển hoặc thai dị tật bẩm sinh, dễ sảy thai. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, khoảng 25% bệnh nhân nam vô sinh có mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng cao. Khoảng 10% số bệnh nhân điều trị vô sinh có thể có tinh dịch đồ bình thường, nhưng có mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng cao. Sự phân mảnh ADN của tinh trùng ảnh hưởng trực tiếp đến tỉ lệ thụ thai và chất lượng phôi thai, từ đó dẫn đến giảm hiệu quả của các biện pháp hỗ trợ sinh sản.

Đã có nhiều nỗ lực nhằm chẩn đoán vô sinh ở nam giới trên cơ sở đánh giá mức độ phân mảnh của tinh trùng nhằm cải thiện, điều trị vô sinh nam. Hiện có một số kỹ thuật được sử dụng để đánh giá mức độ phân mảnh ADN như Comet, Tunel, SCSA, AOT, SCD. Việc đánh giá mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng bằng kỹ thuật kiểm tra mức độ phân tán chất nhuộm sắc của tinh trùng - Sperm Chromatin Dispersion (SCD) là một trong các kỹ thuật phát hiện mức độ

phân mảnh ADN đơn giản, giá thành thấp, tiện lợi và đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới.

Năm 2003, Fernandez và cộng sự đã xây dựng thành công phương pháp khảo sát sự phân tán chất nhiễm sắc của tinh trùng (Sperm Chromatin Dispersion - SCD), xem: Fernandez J.L., et al, "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation", J Androl 24: 59-66. Cơ chế SCD dựa trên nguyên tắc ADN của tinh trùng không bị phân mảnh sẽ tạo quang phổ bắt màu nhuộm sáng (quang phổ halo) đặc trưng quanh lõi nhân tinh trùng, trong khi ADN của tinh trùng bị phân mảnh sẽ không tạo ra được quang phổ sáng hoặc tạo quang phổ sáng rất nhỏ khi xử lý biến tính trong môi trường axit và loại bỏ các protein nhân. Nguyên tắc này đã được thừa nhận và được sử dụng làm kỹ thuật chuẩn trong việc đánh giá mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng. Dựa trên nguyên tắc của phương pháp này, vào năm 2006 Fernandez và cộng sự đưa ra kit thương mại Halosperm (EP 1710320 B1) và được sử dụng rộng rãi trong việc chẩn đoán và điều trị bệnh vô sinh nam.

Mặc dù vậy, kit thương mại sử dụng thuốc nhuộm và dung dịch phá vỡ màng nhân đặc hiệu và có giá thành cao và mất thời gian, trung bình để có kết quả thì cần 2 giờ xét nghiệm và cần nhiều bước thao tác với thời gian nghiêm ngặt, ví dụ cần hai lần ly giải màng nhân tế bào và ba bước rửa tiêu bản lần lượt bằng 70% etanol trong 2 phút, sau đó trong 90% etanol trong 2 phút và cuối cùng là 100% etanol trong 2 phút. Đã có nhiều nghiên cứu nhằm cải tiến hệ dung môi phá màng nhân, nhưng không phá vỡ protein tế bào và vẫn giữ nguyên được hình thái đặc trưng của tế bào tinh trùng (đuôi) đã được tiến hành, nhưng không hiệu quả. Theo phương pháp của Fernandez và cộng sự, các tác giả này đã sử dụng hệ dung dịch chứa 0,2 M dithiothreitol để phá vỡ màng tế bào và sử dụng thuốc nhuộm Wright đặc hiệu để nhuộm. Ví dụ, Nguyễn Thị Thúy An và cộng sự, "Sự phân mảnh ADN của tinh trùng: Nguyên nhân, hậu quả và các xét nghiệm đánh giá", Tạp chí Công nghệ sinh học 11 (3): 393-402, 2013 đã đưa ra cải tiến về hệ dung môi so với phương pháp chuẩn. Tuy nhiên, phương pháp của

các tác giả này không tối ưu được điều kiện thực hiện, hệ dung môi sử dụng do đó trong quá trình ly giải màng nhân, tế bào tinh trùng bị rụng mất đuôi, Sau khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Wright, việc đánh giá tế bào tinh trùng gặp khó khăn do khó phân biệt được tế bào tinh trùng với tế bào bình thường.

Do đó, vẫn cần cải tiến quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng với hệ dung môi ly giải và hệ thuốc nhuộm đặc hiệu bằng hệ dung môi và thuốc nhuộm thông dụng nhằm thay thế, nhưng vẫn giữ được hiệu quả như khi sử dụng các hệ thuốc nhuộm đặc hiệu giúp tăng hiệu quả xét nghiệm, giảm chi phí và linh động trong công tác chẩn đoán và điều trị bệnh.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên. Cụ thể là, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng được cải tiến về hệ dung môi ly giải màng nhân tế bào và thuốc nhuộm cho phép nhuộm ADN của tinh trùng một cách rõ nét mà không phá vỡ tế bào và làm mất đuôi của tinh trùng và kit dùng trong phương pháp này.

Theo khía cạnh thứ nhất, quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng theo giải pháp bao gồm các bước:

a) chuẩn bị tiêu bản bằng cách định lượng tinh trùng đến 10^6 tế bào/ml, sau đó cố định mẫu chứa tinh trùng lên lam kính bằng thạch agaroza 0,3% ở 37°C và để ổn định mẫu ở 4°C trong 15 phút;

b) biến tính ADN của tinh trùng bằng cách đưa tiêu bản đã được ổn định mẫu vào môi trường axit HCl 8% trong 7 phút để gây biến tính ADN của tinh trùng;

c) ly giải màng nhân tế bào tinh trùng bằng cách chuyển tiêu bản chứa tinh trùng đã được biến tính ADN vào dung dịch bao gồm 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH= 7,5 trong 28 phút để ly giải màng nhân tế bào tinh trùng, sau đó rửa sạch bằng nước cất trong 5 phút;

d) nhuộm tiêu bản bằng cách rửa lại tiêu bản bằng etanol 100% trong 6 phút, sau khi để khô tự nhiên, tiến hành nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Giemsa 5% trong 10 phút, sau đó rửa dung dịch thuốc nhuộm bằng nước; và

e) xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng bằng cách xác định tỷ lệ tinh trùng bị phân mảnh ADN theo hình thái tế bào có đuôi được nhuộm từ đó đưa ra được kết luận về mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến kit dùng để xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó kit này bao gồm:

- dung dịch agarosa nồng độ 0,3% để cố định mẫu;
- dung dịch axit HCl 8% để biến tính ADN tinh trùng;
- dung dịch để ly giải màng nhân protein của tinh trùng bao gồm: 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH=7,5; và
- dung dịch thuốc nhuộm Giemsa 5% để nhuộm tiêu bản tinh trùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp hình ảnh của tinh trùng được nhuộm bằng quy trình theo giải pháp hữu ích. (A) Hình thái của tinh trùng không bị phân mảnh ADN và (B) Hình thái của tinh trùng bị phân mảnh ADN.

Hình 2 là ảnh chụp hình thái tế bào với quầng bắt màu nhuộm (quầng halo). (A) hình ảnh quầng bắt màu nhuộm của tế bào tinh trùng khi nhuộm bằng kit thương mại đối chứng, (B) hình ảnh quầng bắt màu nhuộm của tế bào tinh trùng khi nhuộm bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Hình 3 là biểu đồ so sánh tỷ lệ phân mảnh ADN của tinh trùng bằng kit theo giải pháp và kit thương mại đối chứng. Trong đó, DFI 1 là tỷ lệ phân mảnh ADN của tinh trùng sử dụng kit theo giải pháp; DFI 2 là tỷ lệ phân mảnh ADN của tinh trùng sử dụng kit thương mại trên cùng 30 mẫu tinh dịch.

Hình 4 là ảnh tế bào với quầng bắt màu nhuộm (quầng halo) khi nhuộm bằng dung dịch nhuộm Giemsa 5% với những giải nồng độ dithiothreitol thử nghiệm khác nhau để ly giải màng nhân tế bào tinh trùng.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với những phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, những phương án thực hiện đó chỉ mang tính chất minh họa cho giải pháp chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng và kit dùng trong phương pháp này.

Theo khía cạnh thứ nhất, quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị tiêu bản, b) biến tính ADN của tinh trùng, c) ly giải màng nhân tế bào tinh trùng, d) nhuộm tiêu bản; và e) xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng.

Trong bước chuẩn bị tiêu bản, mẫu tinh dịch từ bệnh nhân được bảo quan ở nhiệt độ thường trong vòng 2 tiếng và 4°C trong 24 giờ để làm mẫu xét nghiệm. Để định lượng mẫu, mẫu tinh dịch được pha loãng trong dung dịch nước muối sinh lý nếu mật độ tinh trùng lớn hơn $1,5 \times 10^6/\text{ml}$, ngược lại, mẫu tinh dịch được ly tâm ở tần số 1500 vòng/phút, loại bỏ dịch nổi lấy cặn chứa tinh dịch nếu mật độ thấp hơn 10^6 tinh trùng/ml.

Lam kính được xử lý bằng thạch 0,3% để tạo lớp màng mỏng trên bề mặt lam kính, sau đó phối trộn agarosa lỏng và tinh dịch ở 37°C và nhanh chóng cố định mẫu lên bề mặt lam kính và để ổn định mẫu ở 4°C trong 15 phút cho đông mẫu thu được tiêu bản ổn định mẫu.

Trong bước biến tính ADN của tinh trùng, tiến hành đưa tiêu bản đã được ổn định mẫu vào môi trường axit HCl 8% trong 7 phút để gây biến tính ADN của tinh trùng.

Trong bước ly giải màng nhân tế bào tinh trùng, mục đích của quá trình này nhằm phá vỡ màng nhân, nhưng không phá vỡ màng tế bào, tiến hành chuyển tiêu bản chứa tinh trùng đã được biến tính ADN vào dung dịch bao gồm 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH= 7,5 trong

28 phút. Các tác giả của giải pháp hữu ích nhận thấy rằng, đối với mỗi loại thuốc nhuộm, thời gian và nồng độ dịch đệm ly giải màng nhân ảnh hưởng lớn đến kết quả nhuộm. Đối với dung dịch chứa 0,1M dithiothreitol (DTT), thời gian tối ưu, đủ để ly giải màng nhân, nhưng không đủ để phá vỡ màng tế bào là 28 phút. Thời gian và nồng độ dithiothreitol này được tính toán để sử dụng sao cho có khả năng nhuộm bởi thuốc nhuộm Giemsa. Ngoài ra, việc sử dụng Triton X-100 cũng giúp ổn định được đuôi tinh trùng, không bị đứt gãy. Sau khi phá vỡ màng nhân, dung dịch ly giải được rửa sạch bằng nước cất trong 5 phút.

Trong bước nhuộm tiêu bản, để cố định tế bào, tiến hành rửa tiêu bản bằng etanol 100% trong 6 phút, sau đó để khô tự nhiên và tiến hành nhuộm màu. Thuốc nhuộm được các tác giả sử dụng là dung dịch thuốc nhuộm Giemsa 5%, đây là dung dịch thông dụng, dễ pha chế và được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm. Thời gian nhuộm bằng dung dịch thuốc nhuộm Giemsa 5% là 10 phút, sau đó rửa dung dịch thuốc bằng nước.

Trong bước xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, tiến hành quan sát hình thái tế bào tinh trùng, căn cứ vào quầng bắt màu nhuộm của tế bào tinh trùng (quầng halo), có thể xác định được tỷ lệ tinh trùng bị phân mảnh ADN theo hình thái tế bào có đuôi được nhuộm. Căn cứ theo tỷ lệ về số lượng tinh trùng có quầng bắt màu lớn, nhỏ hoặc không bắt màu có thể đưa ra được kết luận về mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng có trong mẫu thử nghiệm.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến kit dùng để xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó kit này bao gồm:

- dung dịch agarosa nồng độ 0,3% để cố định mẫu;
- dung dịch axit HCl 8% để biến tính ADN tinh trùng;
- dung dịch để ly giải màng nhân protein của tinh trùng bao gồm: 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH=7,5; và
- dung dịch thuốc nhuộm Giemsa 5% để nhuộm tiêu bản tinh trùng.

Theo một phương án của khía cạnh này, kit này còn chứa dung dịch agaroza 0,3% và hướng dẫn sử dụng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Thử nghiệm nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Giemsa với dung dịch ly giải màng nhân chứa các nồng độ dithiothreitol (DDT) khác nhau

Để thử nghiệm và xây dựng được nồng độ chuẩn, các thử nghiệm được tiến hành với các nồng độ từ 0,05M đến 0,3M. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Hình 4 với nồng độ DTT khác nhau với thời gian ly giải là 25 phút. Kết quả thử nghiệm được tổng kết trong Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả hình ảnh thu được khi thử ở các nồng độ dithiothreitol trong các dung dịch ly giải khác nhau

STT	Nồng độ dung dịch ly giải	Kết quả	Nhận xét
1	0,01M DTT; 1M NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,001 M Tris	Hình 4a	Mẫu không ly giải, đầu tinh trùng còn nguyên vẹn, không có quầng halo
2	0,05 M DTT; 1,5M NaCl; 0,5% Triton; 0,05M Tris	Hình 4b	Có hiện tượng ly giải, tuy nhiên chỉ 1 số ít tinh trùng có halo nhỏ
3	0,1M DTT; 2M NaCl; 1%Triton X-100; 0,1 M Tris	Hình 4c	Các tinh trùng đều có quầng halo rõ, tuy nhiên đuôi tinh trùng bị mất hoặc biến dạng
4	0,1 M DTT; 2 M NaCl; 1% Triton X-100; 0,2 M Tris	Hình 4d	Có hiện tượng ly giải rõ rệt, hình ảnh quầng halo rõ ràng, ngoài ra có sự phân biệt rõ kích thước các quầng halo như quầng halo lớn, quầng halo bé
5	0,3 M DTT; 2 M NaCl; 2% Triton X-100; 1 M Tris	Hình 4e	Có hiện tượng ly giải rõ rệt, tuy nhiên đuôi tinh trùng có hiện tượng co lại và lõi nhân biến dạng
6	0,5 M DTT; 3 M NaCl; 2% Triton X-100; 2 M Tris	Hình 4f	Có hiện tượng ly giải rõ rệt, tuy nhiên đuôi tinh trùng có hiện tượng co lại và lõi nhân biến dạng mạnh

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng, việc thay đổi thuốc nhuộm Wright bằng thuốc nhuộm Giemsa bị ảnh hưởng bởi nồng độ DTT trong dung dịch ly giải màng nhân tế bào. Theo đó, khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Giemsa, chỉ những mẫu nào được thực hiện với nồng độ DTT từ 0,1-0,15M thì kết quả cho hình ảnh đẹp, đảm bảo yêu cầu về chất lượng. Việc tăng hoặc giảm nồng độ DTT đều cho kết quả không mong muốn, nghĩa là nếu giảm nồng độ DTT xuống dưới 0,1M thì việc ly giải màng nhân kém, ngược lại khi tăng quá 2M thì đuôi tinh trùng càng co lại, lõi nhân biến dạng và không thể sử dụng được nếu nồng độ DTT lớn hơn 0,3M. Lưu ý rằng, đối với thuốc nhuộm Wright, các thử nghiệm đều cho kết quả khác.

Qua các thử nghiệm các tác giả giải pháp hữu ích nhận thấy rằng, đối với phương pháp nhuộm Giemsa theo quy trình của giải pháp hữu ích, nồng độ DTT 0,1M là nồng độ tối ưu cho hiệu quả bất ngờ khi sử dụng với thuốc nhuộm Giemsa mà có thể quan sát được rõ ràng, màng nhân được ly giải hoàn toàn mà đuôi tinh trùng còn toàn vẹn.

Ví dụ 2. Thử nghiệm đánh giá sự phân mảnh ADN của tinh trùng bằng kit theo giải pháp hữu ích

Để thử nghiệm đánh giá sự phân mảnh ADN của tinh trùng, tiến hành thử nghiệm với 50 mẫu tinh dịch của bệnh nhân. Đối chứng sử dụng kit Halosperm thương mại để so sánh với kit theo giải pháp hữu ích.

Các bước tiến hành đối với kit Halosperm được thực hiện bằng thuốc nhuộm Wright theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các bước tiến hành thực hiện theo kit theo giải pháp hữu ích được thực hiện bằng phương pháp nêu trên.

Đếm số lượng tinh trùng, là những tế bào có đuôi, dưới kính hiển vi quang học. Xác định chính xác kích thước quãng bắt màu nhuộm sáng (quãng halo) theo tiêu chuẩn sau:

- Quãng halo rộng: tế bào có kích thước quãng halo lớn hơn hoặc bằng kích thước đường kính ngang của nhân.

- Quầng halo trung bình: tế bào có kích thước quầng halo nằm trong khoảng 1/3-1 kích thước đường kính ngang của nhân.

- Quầng halo bé: tế bào có kích thước quầng halo nhỏ hơn 1/3 đường kính ngang của nhân.

- Không có quầng halo: tế bào không thấy có quầng halo.

- Có nhân thoái hóa: tế bào có nhân bắt màu kém, không đều.

Tỷ lệ % DFI (tỷ lệ % mức độ phân mảnh) là tỷ lệ xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó tỷ lệ này được tính theo công thức:

$$DFI (\%) = \frac{A + B + C}{\text{Tổng số tế bào tinh trùng}}$$

Trong đó:

A: tổng số tế bào tinh trùng có quầng halo nhỏ

B: Tổng số tế bào tinh trùng không có quầng halo

C: Tổng số tế bào tinh trùng có nhân thoái hóa.

Kết quả thử nghiệm đối với kit theo giải pháp hữu ích được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm đánh giá tỷ lệ phân mảnh ADN của tinh trùng bằng kit và phương pháp theo giải pháp hữu ích

Số thứ tự mẫu	% tế bào có quầng halo rộng	% tế bào có quầng halo trung bình	% tế bào có quầng halo bé	% tế bào không có quầng halo	% tế bào có nhân thoái hóa	% DFI
B1	25,8	24,4	18,0	23,2	8,6	49,8
B2	20,0	14,7	2,0	29,0	34,3	65,3
B3	68,2	19,1	5,9	3,6	3,2	12,7
B4	45,6	25,6	8,6	18,2	2,0	28,8
B5	33,2	24,6	4,6	8,6	29,0	42,2
B6	67,2	17,8	2,8	6,4	5,8	15,0
B7	75,8	12,0	2,2	6,2	3,8	12,2
B8	29,3	48,8	6,6	7,6	7,6	21,9
B9	31,4	29,6	9,6	13,0	16,4	39,0
B10	9,6	6,8	9,0	15,0	59,6	83,6

B11	61,0	18,2	4,6	3,0	13,2	20,8
B12	21,6	7,6	9,2	31,0	30,6	70,8
B13	30,2	29,6	13,2	8,0	19,0	40,2
B14	0	83,0	9,8	3,7	3,5	17,0
B15	23,6	42,0	7,8	7,6	19,0	34,4
B16	75,6	14,0	3,6	3,6	3,2	10,4
B17	71,4	16,0	4,2	2,6	3,8	12,6
B18	57,2	23,8	10,6	5,4	3,0	19,0
B19	68,2	19,4	5,4	5,0	2,0	12,4
B20	41,7	24,2	2,9	11,9	9,3	34,1
B21	65,8	15,1	3,0	11,4	4,7	19,1
B22	61,3	14,4	4,0	8,8	1,5	24,3
B23	41,1	15,5	4,4	11,2	27,4	43,0
B24	69,8	10,8	3,3	4,8	11,3	19,4
B25	31,1	23,8	9,6	12,6	2,9	25,1
B26	69,2	14,2	5,0	6,4	5,2	16,6
B27	25,4	26,8	9,6	13,9	24,3	47,8
B28	44,2	20,1	8,1	17,4	10,2	35,7
B29	74,4	14,1	2,7	3,5	5,3	11,5
B30	77,0	12,0	4,9	3,6	2,5	11,0
B31	50,9	19,2	6,7	11,2	12	29,9
B32	69,4	17,7	4,4	5,6	2,9	12,9
B33	50	19	5	8	18	31
B34	50,2	12,6	3,7	15,2	18,3	37,2
B35	41,5	22,3	5,8	19,1	11,3	36,2
B36	66,9	13,9	6,3	7,1	5,9	19,3
B37	47	14	5,8	20,8	12,4	39
B38	47,4	20,1	7,5	12,8	12,2	32,5
B39	51,1	13	6,5	16,8	12,6	35,9
B40	52,6	18,9	8,1	9,1	11,3	28,5
B41	57,9	14,9	8	12,1	7,1	27,2
B42	62,5	20,1	2,8	10	4,6	17,4
B43	50,7	19,2	6,7	11,2	12,2	30,1
B44	56	23,8	5,8	10,3	4,1	20,2
B45	70	13,8	4	4,4	7,8	16,2
B46	57,5	11,4	8	16,3	6,8	31,1

B47	56,2	8,7	7	12,3	15,8	35,1
B48	51	11,2	4,4	19,8	13,6	37,8
B49	58,3	15,3	5,8	11,5	9,1	26,4
B50	52,1	15,6	8,4	12,2	11,7	32,3

Kết quả thử nghiệm đối với kit thương mại Halosperm đối chứng được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá sự phân mảnh ADN của tinh trùng bằng kit thương mại đối chứng Halosperm

Số thứ tự mẫu	% tế bào có quãng halo rộng	% tế bào có quãng halo trung bình	% tế bào có quãng halo bé	% tế bào không có quãng halo	% tế bào có nhân thoái hóa	% DFI
A1	1,6	49,6	16,6	11,0	21,2	48,8
A2	3,2	31,6	25,4	31,8	8,0	65,2
A3	32,4	53,3	8,0	2,9	3,4	14,3
A4	19,2	50,6	11,2	6,3	12,7	30,2
A5	37,6	21,0	29,6	5,8	6,0	41,4
A6	58,2	26,4	6,0	8,4	1,0	15,4
A7	61,8	25,6	6,0	2,8	3,8	12,6
A8	52,5	24,7	4,0	11,8	7,0	22,8
A9	28,4	30,6	4,6	20,8	15,6	41,0
A10	10,2	4,4	9,0	33,4	43,0	85,4
A11	56,2	25,6	5,0	6,0	7,2	18,2
A12	11,2	18,6	22,2	19,8	28,2	70,2
A13	33,7	21,0	26,1	15,4	3,8	45,3
A14	0	80,0	10,8	5,2	4,0	20,0
A15	56,2	7,2	2,6	20,2	13,8	36,6
A16	19,4	68,2	5,8	2,0	4,6	12,4
A17	74,4	14,8	6,8	2,4	1,6	10,8
A18	54,8	21,2	11,2	6,2	6,6	24,0
A19	43,2	43,8	3,0	4,0	6,0	13,0
A20	57,7	10,6	8,3	11,7	11,7	31,7
A21	44,0	34,3	7,0	7,8	6,9	21,7
A22	58,9	15,7	5,8	7,7	11,9	25,4
A23	33,5	17,6	7,3	29,7	11,9	48,9

A24	52,2	25,4	9,3	5,4	7,5	22,2
A25	56,3	17,4	3,6	8,5	14,2	26,3
A26	46,7	35,1	8,8	6,7	2,7	18,2
A27	39,9	11,6	15,2	15,4	17,9	48,5
A28	51,6	14,0	4,1	10,9	19,4	34,4
A29	78,1	9,6	5,4	3,2	3,7	12,3
A30	68,0	18,1	6,9	3,6	3,4	13,9
A31	56,5	16,2	6,5	11,2	9,6	27,3
A32	73,1	11,3	4,2	6,6	4,8	15,6
A33	53,7	11,4	6,3	16,9	11,7	34,9
A34	43,3	17,5	7,7	21,9	9,6	39,2
A35	43,9	17,6	8,5	14,5	15,5	38,5
A36	63,1	18,3	4,3	8,9	5,4	18,6
A37	46,4	10,5	11	16,8	15,3	43,1
A38	55	10,2	10	14,5	10,3	34,8
A39	46,4	14,8	9,4	12,3	17,1	38,8
A40	55,3	17,3	4,2	10	13,2	27,4
A41	52,5	21,9	12,5	7,4	5,7	25,6
A42	61,9	22,1	5,5	6,2	4,3	16
A43	50	17,7	5,6	17,5	9,2	32,3
A44	56	24,5	6,4	4,3	8,8	19,5
A45	61,9	20,1	1,7	5,9	10,4	18
A46	56,6	9,6	7,4	10	16,4	33,8
A47	44,9	17,9	8,8	19	9,4	37,2
A48	53,1	10,9	7,7	17	11,3	36
A49	63,7	12,9	7,1	7,7	8,6	23,4
A50	58,8	10,8	5,8	9,7	14,9	30,4

Theo kết quả từ bảng 2 và bảng 3 thấy rằng, kit và phương pháp theo giải pháp hữu ích có kết quả thử nghiệm tương đương với kit thương mại Halosperm, điều này cho thấy rằng, việc tối ưu điều kiện phân cắt màng nhân và điều kiện nhuộm bằng thuốc nhuộm Giemsa hoàn toàn có thể giảm được nồng độ DTT và thay thế được thuốc nhuộm Wright đặc hiệu.

Kết quả xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS theo phương pháp của Alman cho thấy kết quả tương đương giữa hai phương pháp trên là rất cao ($R = 0,98$). Tỷ lệ DFI khác biệt giữa hai phương pháp là 1,43 (95% CI (0,68-2,19)).

Kết quả hình ảnh nhuộm màu giữa hai phương pháp được thể hiện trên hình 2a và hình 2b cho thấy phương pháp của giải pháp hữu ích tương đương với phương pháp đối chứng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp theo giải pháp hữu ích cho phép rút ngắn quy trình do chỉ cần một bước ly giải màng nhân tế bào, rút ngắn được thời gian cho phép cho kết quả trong 65 phút, trong khi quy trình chuẩn là 2 giờ. Quy trình theo giải pháp hữu ích chỉ cần một lần ly giải màng nhân và có thể sử dụng được thuốc nhuộm Giemsa thông dụng thay vì phải trải qua hai lần ly giải và sử dụng thuốc nhuộm Wright đặc hiệu.

Quy trình và kit theo giải pháp cải tiến hệ dung môi, trong đó không sử dụng SDS (sodium dodecyl sulfate) gây biến tính và làm tiêu hủy đuôi tinh trùng, khiến việc kiểm tra kết quả nhuộm gặp khó khăn do dễ bị nhầm với tế bào lạ không có đuôi khác.

Quy trình và kit theo giải pháp hữu ích thay đổi thành phần dung dịch ly giải giúp giảm lượng DTT, nhưng vẫn tạo điều kiện thuận lợi cho việc tháo xoắn của các sợi nhiễm sắc, giữ được hình thái của đầu và nhân của tinh trùng và giữ được toàn bộ sợi nhiễm sắc bị phân tán tạo thành quang, từ đó dễ dàng đánh giá được mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản hóa thao tác, ví dụ, chỉ cần một bước ly giải màng nhân và một bước rửa tiêu bản bằng etanol 100% duy nhất trước khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Giemsa, trong khi đó quy trình chuẩn cần hai bước ly giải màng nhân và ba bước rửa tiêu bản lần lượt bằng 70% etanol trong 2 phút, sau đó trong 90% etanol trong 2 phút và cuối cùng là 100% etanol trong 2 phút trước khi nhuộm bằng thuốc nhuộm Wright đặc hiệu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

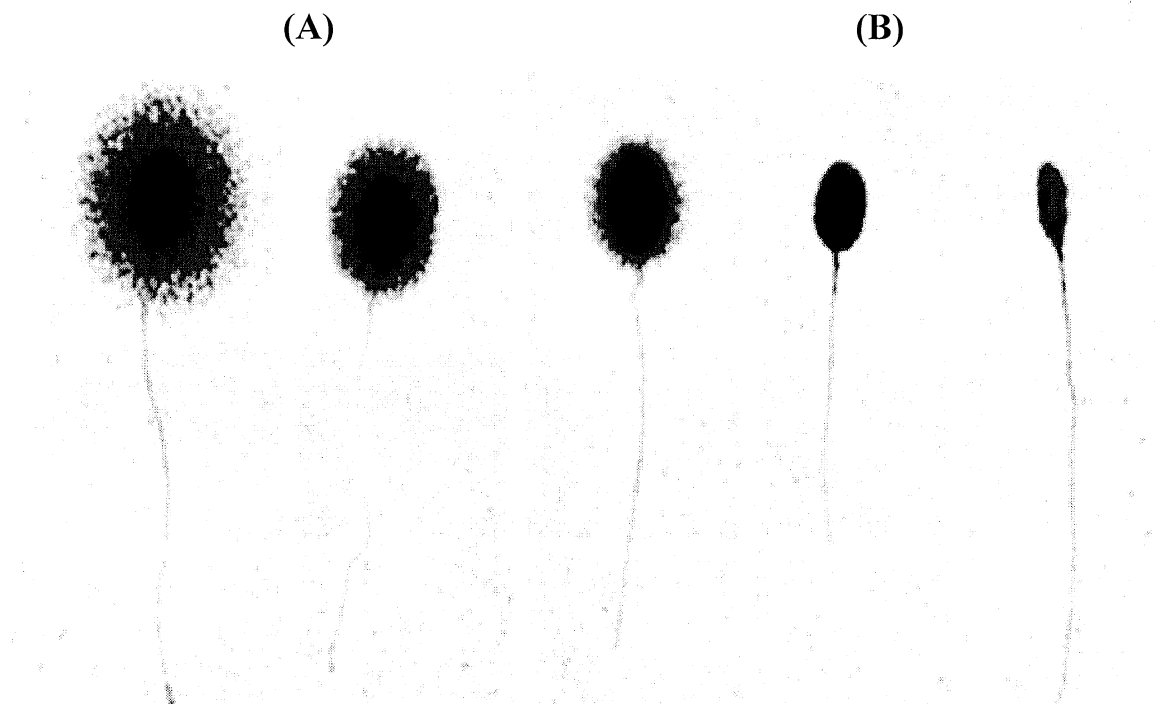
1. Quy trình xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị tiêu bản bằng cách định lượng tinh trùng đến 10^6 tế bào/ml, sau đó cố định mẫu chứa tinh trùng lên lam kính bằng thạch agaroza 0,3% ở 37°C và để ổn định mẫu ở 4°C trong 15 phút;
- b) biến tính ADN của tinh trùng bằng cách đưa tiêu bản đã được ổn định mẫu vào môi trường axit HCl 8‰ trong 7 phút để gây biến tính ADN của tinh trùng;
- c) ly giải màng nhân tế bào tinh trùng bằng cách chuyển tiêu bản chứa tinh trùng đã được biến tính ADN vào dung dịch bao gồm 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH= 7,5 trong 28 phút để ly giải màng nhân tế bào tinh trùng, sau đó rửa sạch bằng nước cất trong 5 phút;
- d) nhuộm tiêu bản bằng cách rửa lại tiêu bản bằng etanol 100% trong 6 phút, sau khi để khô tự nhiên, tiến hành nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Giemsa 5% trong 10 phút, sau đó rửa dung dịch thuốc bằng nước; và
- e) xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng bằng cách xác định tỷ lệ tinh trùng bị phân mảnh ADN theo hình thái tế bào có đuôi được nhuộm từ đó đưa ra được kết luận về mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng.

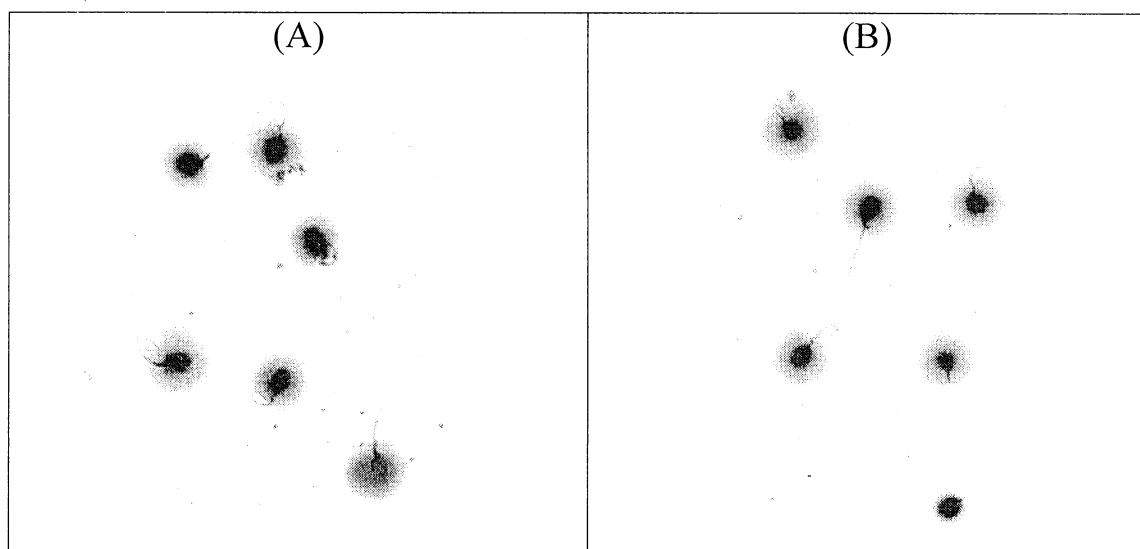
2. Kit dùng để xác định mức độ phân mảnh ADN của tinh trùng, trong đó kit này bao gồm:

- dung dịch agaroza nồng độ 0,3% để cố định mẫu;
- dung dịch axit HCl 8‰ để biến tính ADN tinh trùng;
- dung dịch để ly giải màng nhân protein của tinh trùng bao gồm: 0,1M dithiothreitol (DTT); 2M NaCl; 1% Triton X-100, 0,2 M Tris, độ pH=7,5; và
- dung dịch thuốc nhuộm Giemsa 5% để nhuộm tế bào tinh trùng.

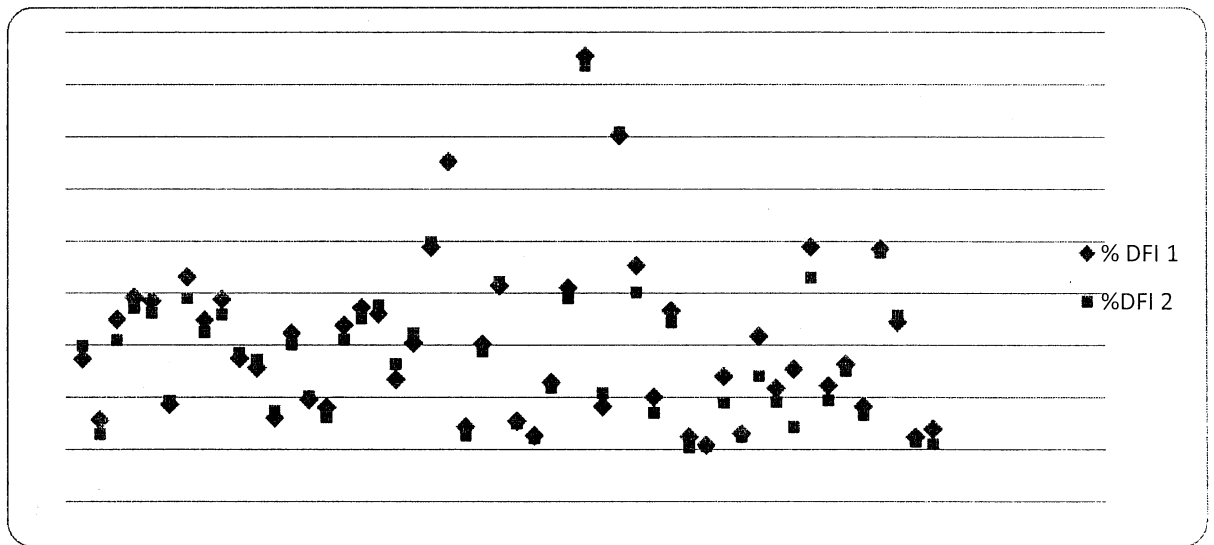
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

