



(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) 
2-0001780

(51)⁷ **C12Q 1/04**

(13) **Y**

(21) 2-2013-00159

(22) 12.07.2013

(45) 27.08.2018 365

(43) 26.01.2015 322

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN (VN)**

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Vân Anh (VN), Nguyễn Hoàng Lương (VN), Phan Tuấn Nghĩa (VN),
Đào Văn Quý (VN), Nguyễn Hoàng Nam (VN), Nguyễn Hoàng Hải (VN), Nguyễn
Minh Hiếu (VN)

(54) **KIT TÁCH CHIẾT ADN CỦA VI KHUẨN LAO MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KIT NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó kit này sử dụng hạt nano oxit sắt từ (Fe_3O_4) được bọc silic và các dung dịch đệm thích hợp để giúp tách ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* mà không cần sử dụng enzym chiết. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến quy trình sản xuất kit tách chiết ADN từ vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng trong y học, cụ thể là đề cập tới kit và quy trình sản xuất kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Kit theo giải pháp kết hợp hạt nano từ được bọc silica (viết tắt là MagSi nano) và các đệm thích hợp để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* trong các mẫu bệnh phẩm. Giải pháp hữu ích cũng đề cập tới quy trình tinh sạch ADN của vi khuẩn lao trên cơ sở từ tính bằng kit theo giải pháp để phát hiện mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật trùng hợp chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction - PCR).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong kỹ thuật chẩn đoán bệnh lao bằng PCR hoặc real time PCR, điều quan trọng nhất là phải tách chiết được ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) với hàm lượng đủ lớn và đảm bảo độ tinh sạch không bị tạp nhiễm bởi các đại phân tử sinh học khác như là protein, enzym, lipid hay polysacarit khác. Do cấu trúc thành tế bào của MTB rất đặc biệt, bao gồm lớp peptidoglycan được bao bọc bởi lớp lipid khá dày nên khó khăn trong việc phá vỡ tế bào để giải phóng ADN hệ gen. Hơn nữa, do các mẫu bệnh phẩm xét nghiệm bệnh lao thường có độ nhớt rất cao (dịch khớp gối, dịch màng phổi, dịch phế quản, đờm, v.v.) và nồng độ vi khuẩn lao trong mẫu bệnh phẩm thường rất thấp, nên việc tách chiết ADN của vi khuẩn lao hiện vẫn gặp nhiều khó khăn. Thông thường, các mẫu bệnh phẩm có độ nhớt cao thường phải tiền xử lý với dung dịch kiềm mạnh để phá vỡ cấu trúc của lớp muxin màng nhầy trước khi tiến hành tách chiết ADN.

Đã có nhiều phương pháp tách chiết ADN của vi khuẩn lao đã được công bố như đun sôi vi khuẩn lao trong đệm TE trong khoảng thời gian từ 10 đến 30 phút (Tortoli và cộng sự, 2001; Svastova và cộng sự, 2002), sử dụng enzym proteinaza K cùng với các dung môi hữu cơ phenol – cloroform – rượu isoamylic (24:25:1, PCI) (Hill và cộng sự, 1972; Rodriguez và cộng sự, 1997), hay phương pháp kết hợp enzym proteinaza K cùng với sóng siêu âm làm vỡ tế bào vi khuẩn lao (Englund và cộng sự, 2001), hay kết hợp các phương pháp đun sôi, sau đó xử lý enzym lysozym, proteinaza

K và dung môi hữu cơ (Somerville và cộng sự, 2005). Từ những năm đầu của thập kỷ 19 trở về đây, phương pháp tách chiết ADN bằng vật liệu silica đang trở nên phổ biến vì hiệu quả tách chiết tốt, ít lẫn các tạp chất và tiết kiệm thời gian. Phương pháp này dựa trên khả năng liên kết bền vững thông qua lực hút tĩnh điện giữa các nhóm phosphat mang điện tích âm của phân tử ADN với bề mặt silica tích điện dương trong môi trường có nồng độ muối cao và sức căng bề mặt thấp (Kathryn và cộng sự, 1996; Huijun và cộng sự, 2000). Các vật liệu silica được sử dụng để tách chiết ADN bao gồm silica gel (Padhye và cộng sự, 1997), hạt silica (Dederich và cộng sự, 2002), màng xốp silica (Esser và cộng sự, 2005) và mới phát triển gần đây là hạt từ bọc silica (Berensmeier và cộng sự, 2006; Nargessi và cộng sự, 2005). Việc sử dụng màng xốp silica, cũng như hạt từ bọc silica đã được phát triển thành kit tách chiết ADN/ARN và được thương mại hóa bởi nhiều công ty như Qiagen, Promega, Invitrogen, v.v.. Tuy nhiên, phương pháp sử dụng màng xốp silica không phù hợp với những mẫu bệnh phẩm có độ nhớt cao, đặc biệt là các mẫu đờm lao, do bước ly tâm mẫu để ADN của MTB bám lên màng xốp và loại bỏ dịch thường gặp phải hiện tượng tắc nghẽn màng.

Trong khi đó, phương pháp sử dụng hạt từ bọc silica cho phép tách chiết ADN của các mẫu có độ nhớt khác nhau với hiệu quả tốt do hạt từ bọc silica sẽ gắn với ADN của vi khuẩn lao và được tách khỏi hỗn dịch bằng lực từ. Phương pháp sử dụng hạt từ bọc silica còn có ưu điểm là dễ thao tác, tiết kiệm thời gian và hiệu quả cao do có thể tự động hóa quá trình tách chiết. Đã có một số nhóm nghiên cứu trước đây nghiên cứu khả năng tách chiết ADN của hạt micro từ bọc silica, ví dụ: R. Caldarelli-Stefano, L. Vago, S. Bonetto, M. Nebuloni, G. Costanzi, Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR, Molecular Pathology, vol. 52, pp. 158-160, 1999.

Một số kit tách chiết ADN của vi khuẩn sử dụng công nghệ hạt từ bọc silica đã được các công ty như Life Technologies, Omegabiotek, Geneaid Biotech, Chemicell, Stratec Molecular thương mại hóa.

Bảng 1. Kit tách chiết ADN của vi khuẩn thương mại sử dụng hạt từ bọc silica

STT	Tên kit	Hãng sản xuất	Địa chỉ web
1	ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit	Life Technologies, Hoa Kỳ	http://products.invitrogen.com/ivgn/product/CS11301
2	Mag-Bind® Bacterial DNA 96 Kit	Omegabiotek, Hoa Kỳ	http://www.omegabiotek.com/products.php?CateID=12
3	Magnetic Beads Genomic DNA Extraction Kit (Bacteria)	Geneaid Biotech, Hoa Kỳ	http://www.geneaid.com/products/magnetic-beads/magnetic-bead-genomic-dna-purification-kit-bacteria
4	GeneMAG-DNA / Bacteria kit	Chemicell, Đức	http://www.chemicell.com/products/purification/dna/index.html
5	InviMag® Bacteria DNA Mini Kit	STRATEC Molecular, Đức	http://www.invitek.de/e1531/e1658/e3410/e7041/e5209/e5596/e5597/index_eng.html

Trong các kit đã nêu trên, các hạt từ bọc silica và hệ đệm tách chiết được tối ưu để sử dụng chiết ADN của vi khuẩn nói chung mà không được tối ưu để phá vỡ thành và màng tế bào của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*. Do đó, đối với mẫu bệnh phẩm để xét nghiệm vi khuẩn lao, cần xử lý enzym lysozym và/hoặc enzym proteinaza K để phá vỡ thành và màng tế bào của vi khuẩn này. Ngoài ra, kích cỡ hạt nano và cường độ từ và các hệ dung dịch đệm, dung dịch rửa, dung dịch đẩy ảnh hưởng rất lớn đến khả năng và hiệu suất chiết ADN của vi khuẩn.

Tài liệu CN1535979 A đã mô tả phương pháp tạo ra hạt nano từ composite và kit chiết tách ADN, trong đó kit bao gồm hạt nano từ bọc silica kích cỡ khoảng từ 50 nm đến 300 nm, đệm phá vỡ tế bào và liên kết ADN, đệm rửa 1-2, và đệm chiết đầy. Tài liệu này thực hiện phản ứng tạo mầm hạt nano sắt từ Fe_3O_4 ở nhiệt độ phòng nên không tạo ra được hạt nano có kích cỡ nhỏ và độ bão hòa từ lớn và quá trình bao lớp vỏ không được điều khiển nên lớp vỏ lớn làm giảm độ từ của hạt nano và tăng kích cỡ hạt (từ 50-300 nm) nên hiệu quả phân tán, tạo liên kết với ADN không cao và diện tích bề mặt tổng cộng tiếp xúc với ADN không lớn, hàm lượng ADN thu hồi không được cải thiện rõ rệt.

Do đó, cần có quy trình sản xuất và kit chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* một cách hiệu quả, sao cho không cần sử dụng enzym để

phá vỡ lớp thành và màng tế bào, đồng thời tăng hiệu suất chiết ADN để có thể chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh lao với mật độ thấp. Ngoài ra, cần cải tiến quy trình sản xuất như tăng cường hiệu suất tạo hạt nano từ cũng như độ từ để đơn giản hóa quy trình sản xuất cũng như nâng cao năng lực xét nghiệm bệnh phẩm chứa vi khuẩn lao.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết vấn đề nêu ở trên, theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* và quy trình sản xuất kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*. Theo đó giải pháp hữu ích sử dụng hạt nano từ bọc silica và các dung dịch đệm thích hợp để chiết đặc hiệu ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* mà không cần sử dụng enzym phá vỡ thành/màng tế bào.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó kit này bao gồm:

hạt MgSi nano bao gồm hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 được bọc silica kích cỡ từ 10 nm đến 100 nm, nồng độ từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ từ 50 emu/g đến 60 emu/g để tạo liên kết ADN-MgSi nano;

dung dịch đệm RB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 mM đến 300mM, EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8 để trung hòa và làm loãng mẫu vi khuẩn;

dung dịch đệm BB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Triton X-100 nồng độ từ 2% đến 5% để phá vỡ tế bào vi khuẩn và liên kết ADN;

dung dịch đệm WB1 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60% để rửa phức hệ ADN-MagSi nano lần 1;

dung dịch đệm WB2 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80% để rửa phức hệ ADN-MagSi nano lần 2; và

dung dịch đệm EB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM để chiết đầy ADN ra khỏi phức hệ ADN-MagSi nano.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* nêu trên, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo hạt MagSi nano bằng cách cho 3 thành phần $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và NH_4OH phản ứng với nhau ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C để tạo mầm hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 , tiếp đó bọc mầm hạt nano này bằng hỗn hợp NH_4OH và tetraethyl orthosilicat để thu được hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (hạt MagSi) có kích cỡ nằm trong khoảng từ 10 nm đến 100 nm, nồng độ từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ nhớt khoảng từ 50 emu/g đến 60 emu/g;

b) tạo dung dịch đệm RB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 300nM với EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8 thu được dung dịch đệm RB;

c) tạo dung dịch đệm BB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Triton X-100 nồng độ từ 2% đến 5% thu được dung dịch đệm BB;

d) tạo dung dịch đệm WB1 bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60% thu được dung dịch đệm WB1;

e) tạo dung dịch đệm WB2 bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80% thu được dung dịch đệm WB2;

f) tạo dung dịch đệm EB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM thu được dung dịch đệm EB; và

g) tạo kit bằng cách khử trùng các thành phần bao gồm hạt MgSi nano, dung dịch đệm RB, dung dịch đệm BB, dung dịch đệm WB1, dung dịch đệm WB2 và dung dịch đệm EB thu được từ bước a) đến bước f) ở trên, sau đó đóng vào các lọ, dán nhãn thu được kit dùng để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả điện di ADN sản phẩm PCR nhân đoạn gen 250 bp đặc hiệu theo Ví dụ 2. Trong đó: 1: thang chuẩn ADN 1Kb. 2: Đối chứng dương với khuôn là ADN của *Mycobacterium Bovis* (*M. bovis*) chuẩn từ vacxin BCG phòng ngừa lao. 3: đối chứng âm không có khuôn ADN. 4-6: lần lượt là sản phẩm ADN của phản ứng PCR với khuôn là ADN của *M. bovis* tách chiết từ 100 µl vacxin có nồng độ 10^5 , 10^4 và 10^3 vi khuẩn/ml bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Hình 2 là kết quả điện di sản phẩm phản ứng so sánh với kit thương mại, trong đó:

Hình 2A là kết quả điện di ADN sản phẩm PCR nhân đoạn gen 250 bp chiết bằng các kit khác nhau: (1): chiết bằng kit ADN Mini (hãng Qiagen, (2): chiết bằng kit ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria (hãng Life Technologies) và (3): chiết bằng kit theo giải pháp. M: thang chuẩn ADN 1 Kb. 1-12: sản phẩm ADN của phản ứng PCR với khuôn lần lượt là ADN tách chiết được từ 12 mẫu bệnh phẩm. (+): đối chứng dương với khuôn là ADN của *M. bovis* chuẩn. (-): đối chứng âm không có khuôn ADN được bổ sung.

Hình 2B là tỷ lệ tương đồng của 3 kit chiết tách ADN bao gồm kit Mini (hãng Qiagen), kit ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria (hãng Life Technologies), và kit theo giải pháp hữu ích (MagPure) theo kết quả của hình 3A.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm minh họa để làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó kit này bao gồm hạt MgSi nano,

dung dịch đệm RB, dung dịch đệm BB, dung dịch đệm WB1, dung dịch đệm WB2 và dung dịch đệm EB.

Hạt MgSi nano có bản chất là hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 được bọc silica kích cỡ từ 10 nm đến 100 nm, nồng độ từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ từ 50 emu/g đến 60 emu/g. Hạt MgSi nano này để tạo liên kết ADN-MgSi nano.

Dung dịch đệm RB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 300nM, EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8. Dung dịch đệm RB này được dùng làm đệm trung hòa và làm loãng mẫu vi khuẩn.

Dung dịch đệm BB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Trixton X-100 nồng độ từ 2% đến 5%. Dung dịch đệm BB này được dùng để phá vỡ tế bào vi khuẩn và liên kết ADN.

Dung dịch đệm WB1 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60%. Dung dịch đệm WB1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi nano lần 1.

Dung dịch đệm WB2 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80%. Dung dịch đệm WB2 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi nano nhằm loại bỏ hoàn toàn GuSCN và GuHCl còn sót lại từ BB và WB1.

Dung dịch đệm EB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM. Dung dịch đệm EB này được dùng để chiết đầy ADN ra khỏi phức hệ ADN-MagSi nano.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo hạt MagSi nano; b) tạo dung dịch đệm RB; c) tạo dung dịch đệm BB; d) tạo dung dịch đệm WB1; e) tạo dung dịch đệm WB2; f) tạo dung dịch đệm EB; và g) tạo kit.

Trong bước tạo hạt MagSi nano, hạt MagSi nano được tạo ra bằng cách cho phản ứng giữa 3 thành phần $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và NH_4OH ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C để tạo mầm hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 . Sau đó, bọc mầm hạt nano này bằng hỗn hợp NH_4OH và tetraethyl orthosilicat để thu được hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (hạt MagSi) có kích cỡ nằm trong khoảng từ 10 nm đến 100 nm. Chuẩn hóa nồng độ hạt MagSi từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ khoảng từ 50 emu/g đến 60 emu/g.

Hòa tan lần lượt muối sắt II clorua ngậm nước ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) và muối sắt III clorua ngậm nước ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) trong nước cất, tiếp đó trộn đều hai dung dịch này tạo thành dung dịch đồng nhất và gia nhiệt đến khoảng từ 50 đến 70°C .

Hòa tan NH_4OH (25%) với nước tạo thành dung dịch đồng nhất và gia nhiệt đến khoảng từ 50 đến 70°C , tiếp đó phối trộn dung dịch này với dung dịch muối sắt thu được ở trên, khuấy trộn đều trong khoảng từ 30 đến 40 phút để phản ứng tạo mầm hạt nano từ có kích cỡ nhỏ và từ độ cao xảy ra hoàn toàn, thu được dung dịch chứa hạt nano từ Fe_3O_4 có kích cỡ trong khoảng từ 10 nm đến 100 nm A. Sau đó, lọc rửa hạt từ bằng cách sử dụng nam châm kết tụ và rửa sạch bằng nước cất, lặp lại đến khi thu được hạt nano oxit sắt từ sạch.

Bọc hạt nano oxit sắt từ bằng lớp silica bằng cách rửa sạch và hòa hạt nano oxit sắt từ bằng etanol theo tỷ lệ khoảng 1-2g/100 ml. Tiếp đó bổ sung NH_4OH (25%) và tetraethyl orthosilicat (TEOS) và nước cất và khuấy đều trong khoảng từ 8 đến 16 giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn, thu được dung dịch chứa hạt oxit sắt từ có lớp bọc silica SiO_2 dày khoảng từ 2 nm đến 5 nm (hạt MagSi nano). Sau khi lọc rửa bằng nước cất, thu được hạt MagSi nano. Hạt MagSi nano này được chuẩn hóa và bảo quản trong dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7,5. Hạt MagSi nano được sử dụng để phá vỡ tế bào và tạo liên kết ADN-MgSi để thuận lợi cho quá trình chiết ADN.

Trong bước tạo dung dịch đệm RB, tiến hành pha đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 300nM với EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8 thu được dung dịch đệm RB. Đệm này có tác dụng trung hòa kiềm ở mẫu bệnh phẩm lao có độ nhớt cao đã được tiền xử lý bằng NaOH và tạo hỗn dịch vi khuẩn có độ đậm đặc thích hợp để ly giải phá vỡ tế bào vi khuẩn ở bước tiếp theo bằng đệm BB.

Trong bước tạo dung dịch đệm BB, tiến hành pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5. Tiếp đó, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Triton X-100 nồng độ từ 2% đến 5% thu được dung dịch đệm BB. Dung dịch đệm BB này có vai trò phá vỡ màng tế bào vi khuẩn để giải phóng ADN hệ gen, đồng thời tạo môi trường đệm thuận lợi và cầu nối ion Na^+ trung gian liên kết giữa ADN hệ gen của MTB và SiO_2 của hạt MagSi nano.

Trong bước tạo dung dịch đệm WB1, tiến hành pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60% thu được dung dịch đệm WB1. Đệm này có tác dụng rửa, loại bỏ các thành phần không phải là axit nucleic, ví dụ như protein, chất béo, hydrocarbon bám không đặc hiệu lên hạt MagSi nano.

Trong bước tạo dung dịch đệm WB2, tiến hành pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80% thu được dung dịch đệm WB2. Đệm này có tác dụng rửa lại, loại bỏ các thành phần không phải là axit nucleic, ví dụ như protein, chất béo, hydrocarbon còn sót lại sau khi rửa bằng dung dịch đệm WB1 mà vẫn còn bám lên hạt MagSi nano.

Trong bước tạo dung dịch đệm EB, tiến hành pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM thu được dung dịch đệm EB. Dung dịch đệm EB này có tác dụng đẩy ADN ra khỏi phức hệ ADN-MagSi nano để thu ADN tinh sạch.

Trong bước tạo kit, tiến hành khử trùng các thành phần bao gồm hạt MgSi nano, dung dịch đệm RB, dung dịch đệm BB, dung dịch đệm WB1, dung dịch đệm WB2 và dung dịch đệm EB thu được ở trên, sau đó đóng vào các lọ, dán nhãn thu được kit dùng để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Tạo kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*

a) Sản xuất hạt nano từ Fe_3O_4 bọc silicagel (hạt MagSi)

Hòa tan lần lượt 0,858 g muối sắt II clorua ngậm nước $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và 1,866 g muối sắt III clorua ngậm nước $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ vào khoảng từ 50 ml đến 100 ml nước cất. Khuấy đều trong khoảng 10 đến 20 phút. Sau đó, trộn đều hai dung dịch muối sắt này thành dung dịch đồng nhất, sau đó gia nhiệt dung dịch này đến 70°C .

Hòa tan khoảng từ 10 ml đến 30 ml NH_4OH (25%) vào khoảng từ 30 ml đến 50 ml nước cất, sau đó gia nhiệt đến 70°C và phối trộn với dung dịch muối sắt đã được gia nhiệt ở trên. Tiến hành khuấy đều trong 30 đến 40 phút để phản ứng tạo mầm hạt nano từ có kích cỡ nhỏ và từ độ cao xảy ra hoàn toàn ta thu được dung dịch chứa 1 gam hạt nano từ Fe_3O_4 có kích cỡ trong khoảng từ 10 nm đến 100 nm.

Dùng nam châm mạnh để ở đáy cốc đựng dung dịch chứa hạt nano từ Fe_3O_4 trong 10 phút và hút bỏ phần dịch trong. Bỏ nam châm ra khỏi đáy cốc, bổ sung nước cất rồi khuấy đều dung dịch trong 5 phút rồi lại để nam châm vào để hút hạt từ. Lặp lại bước rửa này 10 lần, thu được dung dịch chứa hạt nano oxit sắt từ sạch trong nước cất.

Đặt dung dịch chứa hạt nano từ trong nước cất lên nam châm cho đến khi dung dịch bên trên trong rồi hút dung dịch trong phía trên bỏ đi. Bỏ nam châm ra khỏi đáy cốc. Bổ sung etanol, lắc rửa như trên. Quá trình này được lặp lại 3 lần và lần cuối bổ sung còn để thu được từ 50 ml đến 100 ml dung dịch chứa 1g hạt nano oxit sắt từ trong cồn.

Tiếp đó trộn 10 ml NH_4OH (25%) với khoảng 12 ml tetraethyl orthosilicat vào khoảng 100 ml dung dịch cồn chứa hạt oxit sắt từ đã được chuẩn bị sẵn ở bước trên. Bổ sung khoảng từ 30 ml nước cất vào dung dịch và khuấy đều trong khoảng từ 8 giờ đến 16 giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn và thu được dung dịch chứa hạt nano oxit sắt từ có lớp bọc silica SiO_2 dày khoảng từ 2 nm đến 5 nm. Sau khi lọc rửa, thu được dung dịch chứa hạt MagSi nano.

Hạt MagSi nano được chuẩn hóa đến nồng độ nằm trong khoảng từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml. Sau đó lấy 11 ml dịch chứa hạt MagSi nano nồng độ 25 mg/ml cho vào ống falcon 15 ml. Đặt lên nam châm tập trung hạt từ trong thời gian 3 phút rồi hút dịch trong bỏ đi. Bổ sung 5,5 ml dung dịch đệm 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydroclorua (Tris-HCl) 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7,5 và trộn đều. Chia nhỏ vào mỗi ống nhựa đã khử trùng có dung tích 2 ml lượng 1,8 ml hạt MagSi nano, sau đó dán nhãn. Như vậy, nồng độ hạt từ thu được là khoảng 50 mg/ml.

b) Sản xuất các dung dịch đệm

- Tạo dung dịch đệm RB

Trộn khoảng từ 4 ml đến 6 ml đệm 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydroclorua (Tris-HCl) 1M có pH=7 với 5 ml etylenediaminetetraaxetat natri (EDTA) 20 mM có pH 8,0. Cuối cùng bổ sung khoảng từ 10 ml đến 14 ml H₂O khử ion để thu được tổng cộng 20 ml đệm RB.

- Tạo dung dịch đệm BB

Hòa tan từ 5g guanidin hydroclorua (GuHCl) và từ 2g NaCl với 10 ml đệm 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydroclorua (Tris-HCl) nồng độ 100 mM, có pH=7. Tiếp theo, bổ sung và hòa đều từ 2 ml etylenediaminetetraaxetat natri (EDTA) 500 mM, pH=8,0 và từ 0,5 ml CaCl₂ 200 mM vào trong dung dịch. Cuối cùng bổ sung và trộn đều dung dịch với từ 0,8 g Triton X-100 (Merck, Đức) để thu được 20 ml đệm BB.

- Tạo dung dịch đệm WB1

Hòa tan từ 15g GuHCl và từ 8 g NaCl trong 45 ml đệm Tris-HCl 100 mM, pH=7. Cuối cùng, bổ sung từ 55 ml etanol 96° vào dung dịch và trộn đều để thu được 100 ml dung dịch WB1.

- Tạo dung dịch đệm WB2

Hòa tan từ 2g NaCl với 20 ml đệm Tris-HCl 100 mM, pH=7. Bổ sung thêm nước cất khử trùng khử ion đến 30 ml. Cuối cùng thêm khoảng từ 70 ml etanol 96° vào dung dịch và trộn đều để thu được 100 ml dung dịch WB2.

- Tạo dung dịch đệm EB

Trộn 6 ml Tris-HCl 100 mM có pH=8 với khoảng từ 1,5 ml EDTA 20 mM có pH 8,0. Cuối cùng bổ sung khoảng từ 12,5 ml H₂O khử ion để thu được tổng cộng 20 ml dung dịch đệm EB.

c) Tạo kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*

Tiến hành khử trùng các thành phần bao gồm hạt MgSi nano, dung dịch đệm RB, dung dịch đệm BB, dung dịch đệm WB1, dung dịch đệm WB2 và dung dịch đệm EB

thu được ở trên, sau đó đóng từng thành phần vào các lọ kín, dán nhãn, thu được kit dùng để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

Thành phần kit theo giải pháp hữu ích thu được ở trên sử dụng cho 100 phản ứng chiết tách ADN vi khuẩn lao, bao gồm 3 lọ x 18 ml chứa hạt MagSi nano, 1 lọ 20 ml chứa dung dịch đệm RB, 1 lọ 20 ml chứa dung dịch đệm BB, 1 lọ 100 ml chứa dung dịch đệm WB1, 1 lọ 100 ml chứa dung dịch đệm WB2 và 1 lọ 20 ml chứa dung dịch đệm EB.

Ví dụ 2: Tách chiết ADN của vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*

Để thử nghiệm chiết tách ADN của vi khuẩn bằng kit theo giải pháp hữu ích, tiến hành thử nghiệm với mẫu vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*.

Mẫu thử nghiệm là mẫu vi khuẩn lao *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) là một loài thuộc *Mycobacterium tuberculosis* (*MTB*) gây ra bệnh lao phổi cho động vật, cũng như cho người. Mẫu *Mycobacterium tuberculosis* được sử dụng có nồng độ 10^6 vi khuẩn/ml có nguồn gốc từ Công ty sinh phẩm vắc xin số 1 Vabiotech. ADN tách chiết được sau đó được kiểm tra chất lượng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để đoạn gen có kích thước 250 bp đặc hiệu cho *M. bovis*.

Hút 100 μ l mẫu lần lượt có nồng độ 10^5 , 10^4 và 10^3 vi khuẩn/ml cho vào lần lượt 3 ống eppendorft 1,5 ml vô trùng. Bổ sung 100 μ l dung dịch đệm RB vào các ống và trộn đều.

Bổ sung tiếp 200 μ l dung dịch đệm BB để phá vỡ tế bào vi khuẩn và liên kết ADN, trộn đều mẫu và ủ mẫu ở 70°C trong thời gian 30 phút.

Bổ sung 50 μ l hạt MagSi nano và 200 μ l etanol 96° và trộn đều mẫu. Sau khi ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 phút, đặt ống mẫu lên giá từ (nam châm) để tập trung hạt MagSi nano trong thời gian 30 giây. Sau đó loại bỏ dịch.

Bỏ ống ra khỏi giá từ, tiếp đó bổ sung 800 μ l dung dịch đệm WB1 và trộn đều hạt MagSi nano. Tiến hành rửa lặp lại, sau đó bỏ ống ra khỏi giá từ, bổ sung 1000 μ l dung dịch đệm WB2 và trộn đều đều hạt MagSi nano. Tiến hành lặp lại bước rửa bằng dung dịch đệm WB2 một lần nữa và bổ sung 100 μ l dung dịch đệm EB và trộn đều hạt MagSi nano.

Sau khi ủ mẫu ở 70°C trong thời gian 5 phút, chuyển ống mẫu lên giá từ và tập trung hạt MagSi nano trong thời gian 30 giây. Sau đó chuyển dịch (chứa ADN) sang ống eppendofit mới vô trùng. Mẫu ADN thu được này được bảo quản ở 4°C hoặc -20°C cho đến khi nhân PCR.

Để kiểm tra chất lượng ADN tinh sạch thu được, tiến hành chạy PCR với mẫu ADN thu được làm khuôn để nhân đoạn ADN đặc hiệu cho vi khuẩn *M. bovis*. Thành phần master mix của một phản ứng bao gồm 6 µl MgCl₂ 25 mM, 5 µl Go-Buffer 10X, 0,2 µl Go-Taq polymeraza (của hãng Promega, Mỹ) 2,5 µl dNTPs (Ferments, Mỹ), 1 µl mỗi xuôi IS6110 và 1 µl mỗi ngược IS6110 (IDT, Mỹ), nước cất khử trùng được cho vào vừa đủ để cho thể tích của phản ứng là 22 µl. Bổ sung 3 µl ADN đã tách chiết ở trên làm khuôn cho mỗi ống master mix.

Tiến hành PCR với 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm bước biến tính ADN ở 94°C trong 1 phút, bước gắn mồi ở 65°C trong 45 giây và bước kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa 2% sử dụng thang chuẩn ADN 100 bp.

Kết quả thể hiện trên hình 2, giếng số 4-6 ở hình 2 đã cho thấy băng ADN nhân bản bằng PCR có độ sáng, rõ nét cao và có kích thước khoảng 250 bp phù hợp với tính toán lý thuyết đặt ra. Điều này cho thấy rằng kit theo giải pháp hữu ích cho phép chiết được ADN của *M. bovis* với nồng độ và độ tinh sạch cao cho phép chẩn đoán mẫu với ngưỡng nồng độ vi khuẩn rất thấp, khoảng 10³ vi khuẩn/ml.

Ví dụ 3. Thử nghiệm so sánh khả năng chiết ADN của kit theo giải pháp hữu ích với kit thương mại

Để đánh giá hiệu quả của kit theo giải pháp hữu ích trong việc chiết ADN từ vi khuẩn lao, tiến hành thử nghiệm so sánh với các kit trên thị trường.

Thử nghiệm được tiến hành với 12 mẫu đờm được lấy từ bệnh nhân tại bệnh viện Quân đội 103 bao gồm 8 mẫu đờm được chẩn đoán là có mặt của vi khuẩn lao MTB và 4 mẫu đờm còn lại không có mặt của vi khuẩn này bằng phương pháp nhuộm soi AFB (Acid Fast Bacillus). Các mẫu đờm lao chiết ADN bằng ADN Mini kit (hãng Qiagen, (2): chiết bằng ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria (hãng Life Technologies) và (3): chiết bằng kit theo giải pháp để so sánh hiệu quả.

Mẫu đờm của bệnh nhân vào buổi sáng ngay sau khi bệnh nhân thức dậy, giữ lạnh ở -80°C, tiến hành lấy 3ml từng mẫu bệnh phẩm cho vào ống falcon 15ml vô

trùng, sau đó bổ sung 5ml dung dịch SP2, lắc nhẹ để tan mẫu bệnh phẩm, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Tiếp đó bổ sung 5 ml dung dịch SP3, lắc nhẹ và ly tâm vòng/phút trong 20 phút. Bổ dịch nổi, thu cặn (phần cặn và dung dịch còn lại khoảng 0,5 ml) để tách chiết ADN.

Tiến hành tách chiết ADN của vi khuẩn lao trong từng mẫu bằng kit theo giải pháp hữu ích (MagPure) như mô tả ở Ví dụ 2 và bằng kit ChargeSwitch, ADN Mini kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mẫu ADN thu được sau khi chiết bằng các kit tương ứng được sử dụng làm khuôn cho PCR để nhân đoạn gen 250 bp đặc hiệu cho vi khuẩn lao để xác định khả năng chiết ADN. Các mẫu ADN này cũng được tiến hành xác định nồng độ bằng phép đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm.

Kết quả được thể hiện trên Hình 2, trong đó: (1): chiết bằng ADN Mini kit (hãng Qiagen, (2): chiết bằng ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria (hãng Life Technologies) và (3): chiết bằng kit theo giải pháp. M: thang chuẩn ADN 1 Kb. 1-12: sản phẩm ADN của phản ứng PCR với khuôn lần lượt là ADN tách chiết được từ 12 mẫu bệnh phẩm. (+): đối chứng dương với khuôn là ADN của *M. bovis* chuẩn. (-): đối chứng âm không có khuôn ADN được bổ sung.

Đánh giá sản phẩm PCR được tiến hành với chargeSwitch kit và MagPure theo giải pháp. Kết quả đo được thực hiện ở bước sóng 280 nm và 260 nm, sử dụng máy đo quang phổ Nano Drop, Mỹ. Kết quả được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. So sánh độ tinh sạch của các mẫu ADN tách chiết được		
Mẫu	Tỉ lệ $A_{260/280}$	
	ChargeSwitch kit (Life Technologies)	MagPure (theo giải pháp)
1	1,79	1,76
2	1,13	1,69
3	1,49	1,67
4	1,45	1,68
5	0,88	1,55
6	1,37	1,72
7	1,20	1,63

8	1,67	1,80
9	1,49	1,77
10	1,33	1,86
11	1,67	1,74
12	1,13	1,57

Về mặt lý thuyết, mẫu ADN được coi là có độ tinh sạch tốt nếu tỷ lệ A_{260}/A_{280} nằm trong khoảng 1,7 - 2,3. Từ dữ liệu của bảng 2, có 3/12 (25%) mẫu ADN tách chiết được bằng kit ChargeSwitch đạt độ tinh sạch là các mẫu số 1, 8 và 11, các mẫu ADN còn lại bị tạp nhiễm protein do tỉ lệ A_{260}/A_{280} nhỏ hơn 1,7. Bảng 2 cũng chỉ ra rằng, có 10/12 (83%) mẫu ADN tách chiết được bằng kit MagPure theo giải pháp đảm bảo độ tinh sạch. Như vậy, các mẫu ADN thu được bằng kit MagPure theo giải pháp có độ tinh sạch cao hơn khi so sánh với kit ChargeSwitch.

Kết quả ở hình 2 cho thấy kit DNA Mini (Qiagen) cho phép phát hiện các mẫu bệnh phẩm 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 là có mặt của vi khuẩn lao MTB (cột 1, hình 2A), tuy nhiên ở mẫu từ 3 đến 5 xuất hiện các băng phụ không đặc hiệu. Trong khi đó, kit ChargeSwitch (Life Technologies) chỉ cho phép phát hiện các mẫu bệnh phẩm 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10 và 11 là có mặt của vi khuẩn lao MTB (cột 2, hình 3A). Riêng kit MagPure theo giải pháp cho thấy sự xuất hiện của vi khuẩn này ở hầu hết các mẫu bệnh phẩm ngoại trừ mẫu bệnh phẩm số 2 (hình 2B). Như vậy, kết quả dương tính với vi khuẩn lao khi sử dụng kit ADN Mini là 10/12 đạt 75%, ChargeSwitch là 8/12 đạt 67%, ngược lại kết quả dương tính khi sử dụng kit MagPure là 11/12 đạt 92%. Kết quả này cũng cho thấy and tinh sạch bởi kit MagPure cho phép phát hiện vi khuẩn lao MTB bằng kỹ thuật PCR với hiệu quả cao hơn so với cả hai kit ADN Mini và ChargeSwitch. So sánh mức độ tương đồng giữa kết quả phát hiện MTB khi sử dụng ADN tách chiết bởi 3 kit được trình bày ở hình 2B cho thấy kit MagPure theo giải pháp có độ tương đồng với kit ADN Mini là 83%, với ChargeSwitch là 75%, trong khi kit DNA Mini và Charge Switch có độ tương đồng với nhau thấp hơn, chỉ đạt 67%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao theo giải pháp hữu ích cho phép tách chiết được ADN vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* một cách hiệu quả mà không cần sử dụng enzym proteinaza K trong bước xử lý phá vỡ thành và màng tế bào. Việc ứng

dụng hạt oxit sắt từ được bọc silica với kích cỡ thích hợp cho phép dễ dàng tách và tinh chế ADN từ vi khuẩn lao. Việc chiết tách hiệu quả này cho phép chẩn đoán vi khuẩn lao bằng phương pháp PCR với mức thấp.

Phương pháp sản xuất kit chiết ADN của vi khuẩn lao theo giải pháp hữu ích cho phép tổng hợp hạt nano oxit sắt từ bằng phương pháp tạo mầm hạt nano từ Fe_3O_4 có kích cỡ nhỏ và từ độ cao bằng phương pháp đồng kết tủa ở nhiệt độ từ 50°C đến 70°C , sau đó bọc lớp silica bằng hỗn hợp có 2 thành phần NH_4OH và TEOS. Hạt nano từ bọc silica (MagSi nano) có kích cỡ nhỏ khoảng từ 10 nm đến 100 nm có lớp bọc SiO_2 dày khoảng từ 2 nm đến 5 nm, có tính chất siêu thuận từ, nên các hạt phân tán đều trong đệm mà không bị kết tụ. Tính chất này giúp cho hạt có diện tích bề mặt tổng cộng tương tác với ADN lớn, tăng sản lượng ADN gắn kết lên hạt. Các dung dịch đệm được tính toán tối ưu cho phép xử lý được các mẫu bệnh phẩm có độ nhớt cao sau tiền xử lý bằng NaOH và cho phép gắn kết, rửa và đẩy ADN ra khỏi hạt MagSi nano hiệu quả, cho phép tinh sạch được ADN của vi khuẩn.

Quy trình sản xuất kit chiết ADN của vi khuẩn lao theo giải pháp hữu ích cho phép sản xuất ra kit chiết ADN hệ gen của vi khuẩn với hiệu suất cao. Quy trình đơn giản, không cần các bước xử lý phức tạp giúp giảm giá thành sản xuất kit và đơn giản hóa quy trình xét nghiệm bệnh lao cho bệnh nhân.

Kit chiết ADN của vi khuẩn lao theo giải pháp hữu ích có các hạt nano oxit sắt từ với từ độ mạnh, cho phép chiết ADN từ vi khuẩn lao hiệu quả với độ chính xác lên tới 92%, cao hơn với kit thương mại được sử dụng để so sánh (67% và 75%). Kit chiết ADN của vi khuẩn lao theo giải pháp hữu ích cho tỷ lệ % tương đồng cao so với kit thương mại. Kit theo giải pháp dễ dàng sử dụng, thời gian tách chiết ngắn trên nhiều mẫu bệnh phẩm (75 phút cho khoảng từ 12 đến 348 mẫu) có khả năng chiết thủ công trên giá từ hoặc tự động hóa trên thiết bị chiết tự động, dễ dàng ứng dụng với các quy mô xét nghiệm khác nhau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó kit này bao gồm:

hạt MgSi nano bao gồm hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 được bọc silica kích cỡ từ 10 nm đến 100 nm, nồng độ từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ từ 50 emu/g đến 60 emu/g để tạo liên kết ADN-MgSi nano;

dung dịch đệm RB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 300nM, EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8 để trung hòa và làm loãng mẫu vi khuẩn;

dung dịch đệm BB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Trixton X-100 nồng độ từ 2% đến 5% để phá vỡ tế bào vi khuẩn và liên kết ADN;

dung dịch đệm WB1 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60% để rửa phức hệ ADN-MagSi nano lần 1;

dung dịch đệm WB2 bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80% để rửa phức hệ ADN-MagSi nano lần 2; và

dung dịch đệm EB bao gồm đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM để chiết đầy ADN ra khỏi phức hệ ADN-MagSi nano.

2. Quy trình sản xuất kit để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo hạt MagSi nano bằng cách cho 3 thành phần $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và NH_4OH phản ứng với nhau ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C để tạo mầm hạt nano oxit sắt từ Fe_3O_4 , tiếp đó bọc mầm hạt nano này bằng hỗn hợp NH_4OH và tetraethyl orthosilicat để thu được hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ (hạt MagSi) có kích cỡ nằm trong

khoảng từ 10 nm đến 100 nm, nồng độ từ 25 mg/ml đến 50 mg/ml, từ độ khoảng từ 50 emu/g đến 60 emu/g;

b) tạo dung dịch đệm RB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 300nM với EDTA nồng độ từ 1mM đến 2,5mM, pH từ 6 đến 8 thu được dung dịch đệm RB;

c) tạo dung dịch đệm BB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 40 mM đến 60 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 2M đến 4 M, CaCl_2 nồng độ từ 4 mM đến 6 mM, EDTA nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, Trixton X-100 nồng độ từ 2% đến 5% thu được dung dịch đệm BB;

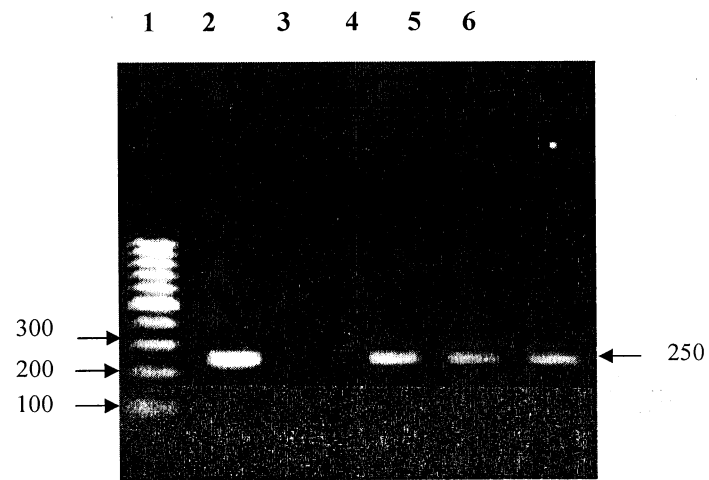
d) tạo dung dịch đệm WB1 bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 30 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorua nồng độ từ 1 M đến 3 M, NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 2 M, etanol nồng độ từ 40% đến 60% thu được dung dịch đệm WB1;

e) tạo dung dịch đệm WB2 bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 30 mM, pH từ 5,0 đến 7,5, bổ sung NaCl nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M, etanol nồng độ từ 60% đến 80% thu được dung dịch đệm WB2;

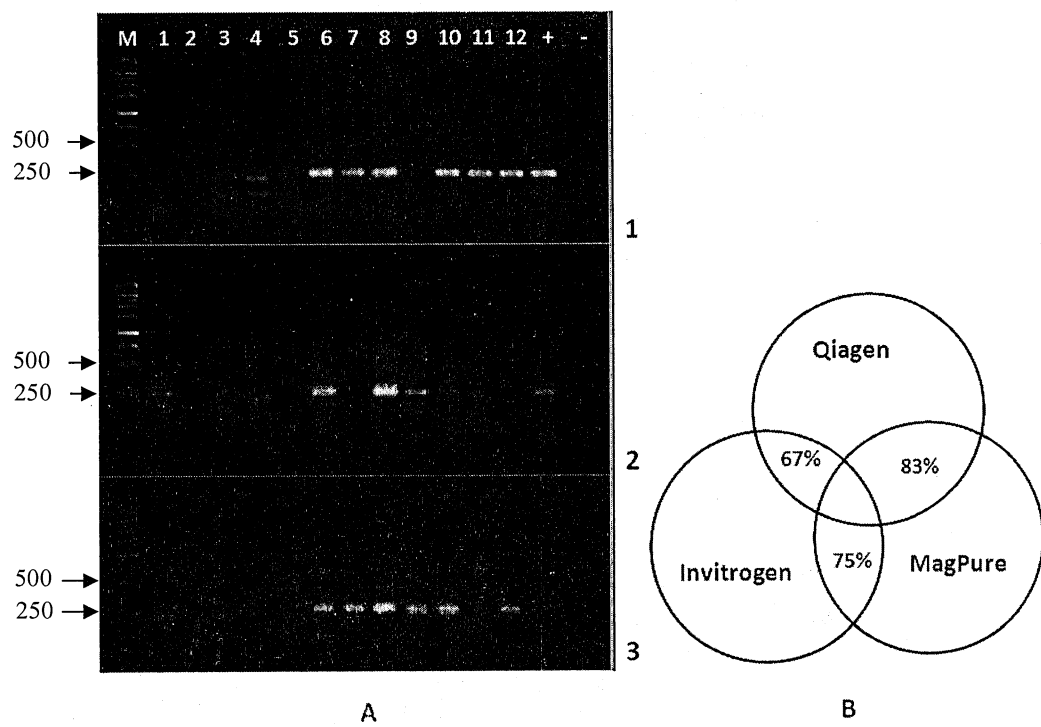
f) tạo dung dịch đệm EB bằng cách pha đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,5 đến 9,0, bổ sung EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM thu được dung dịch đệm EB; và

g) tạo kit bằng cách khử trùng các thành phần bao gồm hạt MgSi nano, dung dịch đệm RB, dung dịch đệm BB, dung dịch đệm WB1, dung dịch đệm WB2 và dung dịch đệm EB thu được từ bước a) đến bước f) ở trên, sau đó đóng vào các lọ, dán nhãn thu được kit dùng để tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

HÌNH 1



HÌNH 2



TÓM TẮT

Giải pháp hữu ích đề cập đến kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*, trong đó kit này sử dụng hạt nano oxit sắt từ (Fe_3O_4) được bọc silic và các dung dịch đệm thích hợp để giúp tách ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* mà không cần sử dụng enzym chiết. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến quy trình sản xuất kit tách chiết ADN từ vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.