(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) **2-0002116**

(51)[7] **C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00303
(22) 09.10.2017
(45) 25.09.2019 378
(43) 27.11.2017 356
(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 Nam (VN), Nguyễn Thị Huyền (VN), Chu Văn Sơn (VN), Nguyễn Minh Hiếu (VN), Phan Tuấn Nghĩa (VN), Nguyễn Hòa Anh (VN)

(54) KIT CHIẾT ADN VÀ/HOẶC ARN TỪ TIÊU BẢN MÔ CỐ ĐỊNH BẰNG FORMALIN VÙI TRONG PARAFIN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KIT NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bao gồm 10 thành phần thích hợp để chiết ADN và/hoặc ARN từ mô ung thư cố định bằng formalin vùi trong parafin. Giải pháp hữu ích cũng đề cập quy trình sản xuất kit này. Kit theo giải pháp hữu ích có khả năng ứng dụng để chiết riêng hoặc đồng thời ADN và ARN từ tiêu bản mô ung thư cố định bằng formalin vùi trong parafin với khả năng chiết ADN và ARN nhanh, hiệu quả mà không cần sử dụng enzym phân giải, kit theo giải pháp hữu ích hữu ích để chẩn đoán đột biến gen và virut gây bệnh ung thư. Bằng cách tối ưu các dung dịch và sử dụng, hạt nano từ được sản xuất bằng kỹ thuật bọc lõi oxit sắt từ bằng silica trong điều kiện gia nhiệt kết hợp siêu âm, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép tạo ra được kít chiết ADN và/hoặc ARN với các hạt nano từ có khả năng bắt giữ hiệu quả ARN và/hoặc AND giúp tăng hiệu quả chiết.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ hóa sinh ứng dụng, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất và kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để phục vụ cho việc xác định và chẩn đoán sớm các bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử, cụ thể là các bệnh ung thư liên quan đến đột biến gen.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việc sử dụng parafin để bảo quản lâu dài các mẫu mô ung thư là một phương pháp hiệu quả giúp cung cấp nguồn mẫu có chất lượng ổn định cho nghiên cứu cũng như các xét nghiệm thường quy trong bệnh viện và chẩn đoán dịch tễ học phân tử trên quy mô lớn. Trong đó, việc chiết ADN và ARN từ các mẫu mô ung thư cố định bằng formalin trong thể vùi parafin (Formalin Fixed Parafin Embedded Tissue, tiêu bản mô ung thư FFPE) là bước đi đầu tiên giúp phát hiện các đột biến gen và các biểu hiện bất thường của các dấu ấn phân tử liên quan đến ung thư. Qua đó, giúp các bác sỹ lâm sàng tiên lượng được bệnh, chẩn đoán chính xác hơn và chỉ định điều trị thuốc hướng đích hiệu quả. Chẩn đoán ung thư học phân tử sẽ thất bại nếu không tách chiết được vật liệu di truyền từ các mẫu mô đã được xử lý formalin và cố định bằng parafin (Finke và cộng sự, 1992; Koopman và cộng sự 1993; Cao và cộng sự, 2003; Coura và cộng sự, 2003; Bonin và cộng sự, 2003; Korbler và cộng sự 2003; Ludyla và cộng sự, 2012; Masuda và cộng sự 1999; Gilbert và cộng sự 2007; McSherry và cộng sự 2007).

Hiện việc chiết ADN và ARN từ các tiêu bản mô ung thư FFPE còn gặp nhiều khó khăn gây trở ngại cho các kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử. Nguyên nhân chính do: (1) Hiệu quả tách chiết ADN từ các tiêu bản mô ung thư FFPE thấp do số lượng tế bào ít, một phần ADNA bị phân hủy do quy trình chuẩn bị mẫu mô ung thư FFPE bắt buộc phải xử lý nhiệt và xử lý hóa chất để loại bỏ liên kết chéo giữa các nhóm chức amin do mẫu mô ung thư được cố định bằng formalin; (2) Biến đổi hóa học trong quy trình chuẩn bị mẫu mô ung thư EFPE (ADN/ARN-protein cross-links và loại purin) dẫn tới việc tạo thành các liên kết protein-protein và ADN/ARN-protein. kết quả ADN/ARN bám chặt với protein nội bào khiến việc tách chiết rất khó khăn.

Việc xử lý mẫu mô với formalin làm biến đổi số lượng lớn cấu trúc hóa học của nucleotit, nghiên cứu cho thấy có tới 60% adenine bị biến đổi, ảnh hưởng lớn đến các kết quả chẩn đoán bằng các kỹ thuật sinh học phân tử; và (3) Sự tồn dư formalin và xylen trong bảo quản và xử lý mẫu gây ức chế phản ứng phân giải mô của proteinkinaza K làm giảm hiệu quả tách chiết ADN. Đồng thời, lượng tồn dư đó cũng ức chế phản ứng PCR nhân bản đoạn gen đặc hiệu gây khó khăn trong phát hiện các đột biến ung thư về sau (Rivero và cộng sự, 2006; Sato và cộng sự, 2001).

Đã có nhiều nghiên cứu nhằm phát triển các phương pháp chiết ADN và ARN từ các tiêu bản mô ung thư FFPE. Một hướng nghiên cứu được nhiều nhóm tác giả tiếp cận trong khoảng 10 năm gần đây là dựa trên nền tảng nguyên lý của phương pháp Boom (Boom và cộng sự, 1990), có thể kể đến là nghiên cứu tách ADN từ mô ung thư FPE của tác giả Gilbert và cộng sự, 2007; ADN từ mô ung thư FFPE của Farrugia và cộng sự, 2010, hay nghiên cứu của Stephan và cộng sự, 2004 trong việc chiết ARN từ mô ung thư FFPE. Trong các phương pháp này, ban đầu khối mô parafin được hòa tan bằng xylen hoặc dầu khoáng để thu khối mô ung thư (đã được xử lý bằng formalin). Nhờ tác dụng của proteinaza K và một số chất diện hoạt, màng tế bào bị phá hủy để giải phóng ra ADN và ARN. Tiếp theo, bước xử lý nhiệt giúp loại bỏ liên kết chéo giữa các nhóm chức amin của ADN và ARN do mẫu mô ung thư được cố định bằng formalin. Trong môi trường có nồng độ muối guanidin cao và sức căng bề mặt thấp, các nhóm chức SiO_2 sẽ liên kết bền vững với các phân tử ADN và ARN. Trong cùng điều kiện đó, silica không có khả năng liên kết với protein và các đại phân tử sinh học khác. Như vậy, khi hỗn hợp gồm ADN, ARN, protein và các đại phân tử sinh học khác đi qua cột có gắn màng xốp silica nhờ ly tâm thì các phân tử ADN và ARN sẽ được giữ lại vì liên kết với silica, còn các thành phần khác sẽ bị rửa trôi. Tùy từng mục đích tách chiết ADN hay ARN mà các nhà nghiên cứu sẽ pha chế các enzym DNAza hay RNAza để thủy phân thành phần không mong muốn trên cột và sử dụng đệm rửa để loại bỏ, sau đó sử dụng đệm chiết đẩy để thu được ADN hoặc ARN. Phương pháp này có ưu điểm là axit nucleic thu được có độ tinh sạch và nồng độ cao, thời gian không quá dài và do đó phù hợp với các xét nghiệm. Tuy phương pháp này tiết kiệm thời gian khi tiến hành tinh sạch với số lượng mẫu nhỏ (từ 3 đến 4 tiếng cho từ 12 đến 24 mẫu), nhưng thời gian sẽ kéo dài đáng kể nếu số mẫu lớn hơn 24. Một hạn chế khác nữa là phương pháp này cần phải sử dụng máy ly tâm hoặc bơm hút chân không, do đó

không thể tự động hóa được quy trình tinh sạch. Để khắc phục nhược điểm này, việc sử dụng hạt oxit sắt từ tính bọc silica (Fe_3O_4@SiO_2) là một cải tiến mang tính đột phá trong xét nghiệm (Ribeiro-Silva và cộng sự 2007). Các phân tử axit nucleic sau khi liên kết với hạt micro từ bọc silica sẽ được giữ lại và tách riêng ra khỏi protein và các hợp chất khác nhờ nam châm. Axit nucleic sẽ thu được dưới dạng tinh sạch khi được tách ra khỏi hạt micro từ bọc silica bằng dung dịch đệm có nồng độ muối thấp hoặc bằng nước cất. Phương pháp này có ưu điểm là hiệu quả tinh sạch axit nucleic cao, không bị lẫn các dung môi hữu cơ. Phương pháp này cho phép tinh sạch trên một số lượng lớn mẫu bệnh phẩm một các nhanh chóng, do đó rất tiết kiệm thời gian. Điều đặc biệt, việc sử dụng hạt nano từ cho phép tiến hành tinh sạch một các tự động nhờ robot với quy trình đơn giản và thời gian tách chiết rút ngắn còn khoảng 3 tiếng cho từ 24 đến 96 mẫu tùy vào số giếng trên giá từ của hệ thống tách chiết tự động.

Hiện nay, đã có một số hãng đã sản xuất và thương mại các kit chiết ADN và ARN như Life Technology, Omega Biotek, Promega (Mỹ) sản xuất kit chiết ADN và ARN từ tiêu bản mô ung thư FFPE mình bằng hạt nano từ bọc silica để ứng dụng trong hệ thống máy tách chiết tự động. Việc phát triển bộ kit 3 trong 1 có thể tách chiết đồng thời ADN và ARN, hoặc từng loại ADN, hay ARN từ tiêu bản mô ung thư FPE mới được nghiên cứu bởi Life Technology, Omega Biotek, Promega, còn lại 2 hãng Omega Biotek và Promega hiện mới phát triển được riêng rẽ 2 bộ kit tách ADN hoặc ARN từ tiêu bản mô ung thư FFPE.

Tuy nhiên, hạt Dynabeads™ MyOne™ Silane oxit sắt bọc silica được chế tạo bởi hãng Life Technologies trong kit MagMAX™ FPE DNA/RNA Ultra Kit có kích cỡ ở mức micro, chính vì vậy tổng diện tích bề mặt của silica gắn với ADN và ARN sẽ không lớn, dẫn đến hàm lượng ADN và ARN thu hồi sẽ bị hạn chế. Các tính chất mô tả như trên của các bộ kit là lý do chính dẫn tới hiệu suất tách chiết ADN/ARN không cao.

Cũng đã có một số cải tiến đối với kit nêu trên, cụ thể CN1535979 A đã đề cập đến phương pháp tách chiết ADN bằng cách sử dụng vật liệu nano từ compositt và kit chiết ADN kèm theo sử dụng hạt nano từ bọc silica kích thước khoảng từ 50 nm đến 300 nm, đệm phá với tế bào và liên kết ADN, đệm rửa 1-2, và đệm chiết dẩy. Trong sáng chế này, phản ứng tạo mầm hạt nano sắt từ Fe_3O_4 được thực hiện ở nhiệt độ phòng nên hiệu suất tạo mầm hạt nano kích thước nhỏ có từ độ bão hòa lớn. Trong quá

trình tạo lớp vỏ silica cho hạt từ, không khống chế được độ dày của lớp vỏ bọc SiO_2 nên hạt thu được có từ tính không đồng đều. Vì vậy, kích thước hạt nano từ khá lớn (50-300 nm), và mức độ hấp thụ ADN cũng như kết tụ hạt từ bằng từ trường không hiệu quả, điều này dẫn đến thất thoát lượng ADN nên kết quả việc thu hồi ADN không được cải thiện rõ rệt so với kit MagMAX™ . Ngoài ra bộ kit mô tả trong sáng chế chỉ gồm các đệm để tách ADN/ARN từ các mẫu thông thường chứ không phải được phát triển để tách ADN/ARN từ các mẫu tiêu bản mô ung thư cố định bằng formalin vùi trong parafin, nên chỉ phù hợp với tách chiết ADN/ARN từ các mẫu bệnh phẩm khác như máu, nước tiểu chứa các virus, vi khuẩn có cấu trúc thành tế bào đơn giản.

Do đó, cần có kit và phương pháp sản xuất kit có khả năng chiết ADN và/hoặc ARN một cách đồng thời từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin giải quyết được vấn đề ảnh hưởng của hóa chất bảo quản đồng thời tăng được lượng ADN và/hoặc ARN thu được nhằm nâng cao hiệu quả xét nghiệm các bệnh liên quan đến di truyền, đặc biệt là trong việc phát hiện ung thư giai đoạn sớm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin và quy trình sản xuất kit này. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến kit chiết ADN và ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin, trong đó kit này bao gồm 10 thành phần sau:

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
1	MagSi	Dung dịch đệm Tris-HCl chứa 50 mg/ml hạt nano oxit sắt từ bọc silica kích thước 30-50nm, độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g, pH từ 5 đến 7,5	3 x 1,8ml
2	LB	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7 đến 9	20 ml
		Natri docecyl sulphat (DSD) nồng độ từ 0,2% đến 2%	
		Canxi clorua nồng độ từ 1mM đến 5mM	
3	BB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20nM đến 80nM, pH từ 4 đến 5	40 ml

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2m đến 5M	
		Kali axetat nồng độ từ 0,2M đến 0,8M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
4	BB2	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-80mM, pH 6,5-8,0	40 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2M đến 5M	
		Natri xitrat nồng độ từ 0,05M đến 0,2M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
5	WB1-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-50nM, pH 6,0-7,5	30 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
6	WB2-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10nM đến 20nM, pH từ 6,0 đến 7,5	30ml
		Natri clorua nồng độ từ 0,1M đến 0,5M	
7	WB1-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nm đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
8	WB2-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nM đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
9	EB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25nM đến 35nM, pH từ 7,5 đến 9,0	20ml
		EDTA nồng độ từ 1nM đến 2nM	
10	EB2	Nước cất đã được xử lý bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), pH từ 6,0 đến 6,5	20ml.

Theo một phương án của khía cạnh này, kit theo giải pháp hữu ích còn có thêm hướng dẫn sử dụng để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để chẩn đoán bệnh ung thư.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất kit theo giải pháp hữu ích, trong đó quy trình này bao gồm các công đoạn:

a) Tạo hạt MagSi nano bọc silica:

- tạo hạt nano oxit sắt từ bằng cách hòa tan lần lượt $FeCl_2.4H_2O$ và $FeCl_3.6H_2O$ với nước đạt nồng độ từ 0,4 đến 4% và khuấy đều trong khoảng từ 20 đến 30 phút, sau đó phối trộn hai dung dịch này theo tỷ lệ trọng lượng $FeCl_2.4H_2O/FeCl_3.6H_2O$ từ 1/2 đến 1/3 (w/w) và gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng 50 đến 70°C, sau đó bổ sung dung dịch NH_4OH nồng độ khoảng từ 5 đến 15% đã được gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng từ 50 đến 70°C theo tỷ lệ thể tích từ 1/3 đến 1/4 (w/w), sau khi khuấy trộn đều trong khoảng từ 30 đến 40 phút để phản ứng tạo mầm hạt nano xảy ra thu được dung dịch chứa hạt nano oxit sắt;

- thu hạt nano oxit sắt từ bằng cách sử dụng từ trường mạnh tác dụng lên dung dịch chứa hạt nano Fe_3O_4 trong thời gian từ 5 đến 15 phút để hạt nano tụ xuống, sau đó loại bỏ phần dịch, ngắt từ trường và bổ sung nước cất để rửa, tiếp đó tác dụng từ trường từ 5 đến 15 phút để tụ hạt nano và loại bỏ nước, lặp lại từ 5 đến 10 lần, thu được hạt nano oxit sắt từ; và

- thu hạt MagSi nano bọc silica bằng cách rửa hạt nano oxit sắt từ thu được ở trên bằng cồn, sau đó pha với dung dịch cồn theo tỷ lệ từ 1 đến 2% (g/ml) và bổ sung khoảng từ 5 đến 20% dung dịch bao gồm NH_4OH 25% đã pha với tetraethyl orthosilicat (TEOS) theo tỷ lệ 50/50 (w/w), sau đó bổ sung khoảng 10 đến 30% nước cất và để hỗn dịch này trong bể siêu âm với tần số từ 30 đến 40 kHz trong thời gian từ 1 đến 2 giờ thu được hạt nano sắt từ được bọc lớp silica SiO_2 dày khoảng từ 2 đến 5nm, sau đó lọc rửa bằng nước cất thu được hạt MagSi nano bọc silica kích thước từ 30-50nm có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g;

b) Tạo 10 dung dịch đệm sau:

- tạo dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica (MagSi) bằng cách chuẩn hóa hạt MagSi nano bọc silica thu được ở bước a) và pha với dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7 đến nồng độ 50 mg/ml, sau khi trộn đều thu được dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g, dung dịch đệm MagSi này được dùng để liên kết đặc hiệu với ADN và ARN;

- tạo dung dịch đệm phân giải (LB) bằng cách bổ sung lần lượt natri dodecyl sulphat (SDS) nồng độ từ 0,2 đến 2%, canxi clorua nồng độ từ 1 mM đến 5 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7,0 đến 9,0 trộn đều, dung dịch đệm LB này được dùng để phá vỡ khối mô, giải phóng ARN và ADN;

- tạo dung dịch đệm liên kết 1 (BB1) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, kali axetat nồng độ từ 0,2 M đến 0,8 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 4,0 đến 5,0 trộn đều, dung dịch đệm BB1 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc ADN lên cột;

- tạo dung dịch đệm liên kết 2 (BB2) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, natri xitrat nồng độ từ 0,05 M đến 0,2 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 6,5 đến 8,0 và trộn đều, dung dịch đệm BB2 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc cả ADN và ARN lên cột;

- tạo dung dịch đệm rửa 1-1 (WB1-1) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 50 mM, pH từ 6,0 đến 7,5 và trộn đều, sau đó bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%, dung dịch đệm WB1-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 1;

- tạo dung dịch đệm rửa 2-1 (WB2-1) bằng cách hòa tan natri clorua nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 20 mM, pH từ 6,0 đến 7,5, dung dịch đệm WB2-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 2;

- tạo dung dịch đệm rửa 1-2 (WB1-2) bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5, sau đó bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M, sau đó bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%, dung dịch đệm WB1-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 1;

- tạo dung dịch đệm rửa 2-2 (WB2-2) bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5, dung dịch đệm WB2-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 2;

- tạo dung dịch đệm đẩy 1 (EB1) bằng cách hòa tan EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,0 đến 9,0, dung dịch đệm EB1 này được dùng để đẩy ADN ra khỏi hạt MagSi; và

- tạo dung dịch đệm đẩy 2 (EB2) bằng cách xử lý nước cất bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), chỉnh pH từ 6,0 đến 6,5, dung dịch đệm EB2 này được dùng để đẩy ARN ra khỏi hạt MagSi; và

c) Tạo kit bằng cách đóng lọ 10 dung dịch thu được ở bước b) với các thành phần và định lượng như sau:

stt	Thành phần	Ký hiệu	Định lượng (ml/lọ)	Số lượng (lọ)
1	Dung dịch đệm chứa hạt MagSi	MagSi	1,8	3
2	Dung dịch đệm phân giải	LB	20	1
3	Dung dịch đệm liên kết 1	BB1	40	1
4	Dung dịch đệm liên kết 2	BB2	40	1
5	Dung dịch đệm rửa 1-1	WB1-1	30	1
6	Dung dịch đệm rửa 2-1	WB2-1	30	1
7	Dung dịch đệm rửa 1-2	WB1-2	100	1
8	Dung dịch đệm rửa 2-2	WB2-2	100	1
9	Dung dịch đệm đẩy 1	EB1	20	1
10	Dung dịch đệm đẩy 2	EB2	20	1

Theo một phương án, quy trình sản xuất kit theo giải pháp hữu ích còn bao gồm thêm bước dãn nhãn cho từng lọ và đóng gói kit cùng hướng dẫn sử dụng kit để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết ADN và/hoặc ARN bằng kit theo giải pháp hữu ích để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả điện di ADN là sản phẩm của phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) nhân đoạn gen 250 bp đặc hiệu cho gen *Braf* chỉ thị ung thư từ khuôn ADN tách từ tiêu bản mô ung thư FPE bằng kit theo giải pháp hữu ích. Trong đó 1: Thang chuẩn ADN 100 bp; 2: Đối chứng âm không có khuôn ADN; 3: Đối chứng dương có khuôn ADN chứa đoạn gen *Braf*; 4 và 5: sản phẩm ADN của phản ứng PCR với khuôn ADN tách chiết được từ 2 tiêu bản mô ung thư của 2 bệnh nhân 1 và 2.

Hình 2 là một đoạn trình tự gen *Braf* của bệnh nhân 2 với các pic A, T, G, C rõ nét.

Hình 3 Đường biểu diễn khuếch đại tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu cho ARN thông tin (mRNA) của gen *GAPDH* trong phản ứng phiên mã ngược kết hợp chuỗi polymeraza thời gian thực (RT-PCR), sử dụng khuôn ARN tổng số chiết từ tiêu bản mô ung thư cố định bằng formalin vùi trong parafin của 03 bệnh nhân khác nhau ký hiệu BN1, BN2 và BN3.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ dung dịch đệm Tris-HCl chỉ dung dịch 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochlorit, đây là dung dịch đệm chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dung dịch này có thể mua được ngoài thị trường. Ngoài ra, các dung dịch đệm hoặc các hóa chất được sử dụng để chế sản xuất kit theo giải pháp hữu ích là các hóa chất chuẩn, được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hạt MagSi nano bọc silica hay còn gọi là hạt nano oxit sắt từ được bọc bằng silica, là hạt oxit sắt từ được bọc silica và được tạo ra bằng quy trình theo giải pháp hữu ích có kích thước nano. Theo đó, về bản chất có thể gọi hạt MagSi nano bọc silica là các hạt silica mang từ tính có lõi là hạt oxit sắt từ. Các hạt này cho phép ADN hoặc ARN bám lên bề mặt bởi lực hút tĩnh điện. Bằng kỹ thuật bọc lõi oxit sắt từ bằng silica trong điều kiện gia nhiệt kết hợp siêu âm thu được hạt MagSi nano bọc silica từ tính có kích thước và có độ từ hóa thích hợp để sử dụng trong chiết ADN và/hoặc ARN.

Tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin chỉ mẫu mô được bảo quản trong parafin, các mô này được xử lý bằng formalin và được bọc trong parafin tránh việc làm hỏng mẫu và là mẫu mô thường quy sử dụng trong xét nghiệm tế bào. Mẫu mô được sử dụng là mẫu mô bất kỳ của động vật, tốt hơn là của người, tốt hơn là mẫu mô ung thư hoặc mẫu mô nghi ngờ mắc bệnh ung thư của người.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin, quy trình sản xuất kit này và quy trình chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Kit theo giải pháp hữu ích chỉ kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin, trong đó kit này bao gồm 10 thành phần sau:

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
1	MagSi	Dung dịch đệm Tris-HCl chứa 50 mg/ml hạt nano oxit sắt từ bọc silica kích thước 30-50nm, độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g, pH từ 5 đến 7,5	3 x 1,8ml
2	LB	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7 đến 9	20 ml
		Natri docecyl sulphat (DSD) nồng độ từ 0,2% đến 2%	
		Canxi clorua nồng độ từ 1mM đến 5mM	
3	BB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20nM đến 80nM, pH từ 4 đến 5	40 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2m đến 5M	
		Kali axetat nồng độ từ 0,2M đến 0,8M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
4	BB2	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-80mM, pH 6,5-8,0	40 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2M đến 5M	
		Natri xitrat nồng độ từ 0,05M đến 0,2M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
5	WB1-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-50nM, pH 6,0-7,5	30 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
6	WB2-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10nM đến 20nM, pH từ 6,0 đến 7,5	30ml
		Natri clorua nồng độ từ 0,1M đến 0,5M	
7	WB1-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nm đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
8	WB2-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nM đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
9	EB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25nM đến 35nM, pH từ 7,5 đến 9,0	20ml
		EDTA nồng độ từ 1nM đến 2nM	
10	EB2	Nước cất đã được xử lý bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), pH từ 6,0 đến 6,5	20ml.

Theo một phương án của khía cạnh này, kit theo giải pháp hữu ích còn có thêm hướng dẫn sử dụng để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để chẩn đoán bệnh ung thư.

Cần lưu ý rằng, kit theo giải pháp hữu ích có thể sử dụng để dùng để chiết ADN và/hoặc ARN cho 100 phản ứng PCR chuẩn. Tỷ lệ sử dụng hạt MagSi nano bọc silica đối với mỗi phản ứng tách ADN và/hoặc ARN đủ cho một phản ứng PCR chuẩn là khoảng từ 2-3 mg. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn có thể thay đổi định lượng của kit theo giải pháp hữu ích theo tỷ lệ tương ứng để tạo ra các kit sử dụng cho 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 200, 300, 400, 500 hoặc 1000 phản ứng mà lượng hạt MagSi nano bọc silica cho mỗi phản ứng chiết là không đổi. Theo đó, kit dùng để chiết ADN và/hoặc ARN cho 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 200, 300, 400, 500 hoặc 1000 phản ứng cũng là các phương án ưu tiên theo giải pháp hữu ích.

MagSi chỉ dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách hòa hạt MagSi nano bọc silica với dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7 đến nồng độ 50 mg/ml, sau khi trộn đều thu được dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g. Dung dịch đệm MagSi này được dùng để liên kết đặc hiệu hạt MagSi nano bọc silica với ADN và ARN.

LB chỉ dung dịch đệm phân giải, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách bổ sung lần lượt natri dodecyl sulphat (SDS) nồng độ từ 0,2 đến 2%, canxi clorua nồng độ từ 1 mM đến 5 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH

từ 7,0 đến 9,0. Dung dịch đệm LB này được dùng để phá vỡ khối mô, giải phóng ARN và ADN.

BB1 chỉ dung dịch đệm liên kết 1, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, kali axetat nồng độ từ 0,2 M đến 0,8 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 4,0 đến 5,0. Dung dịch đệm BB1 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc ADN lên cột phân tách ADN.

BB2 chỉ dung dịch đệm liên kết 2, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, natri xitrat nồng độ từ 0,05 M đến 0,2 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 6,5 đến 8,0. Dung dịch đệm BB2 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc cả ADN và ARN lên cột phân tách ADN và ARN.

WB1-1 chỉ dung dịch đệm rửa 1-1, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 50 mM, pH từ 6,0 đến 7,5. Để ổn định, dung dịch đệm WB1-1 này được bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60% trước khi sử dụng làm dung dịch để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 1.

WB2-1 chỉ dung dịch đệm rửa 2-1, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách hòa tan natri clorua nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 20 mM, pH từ 6,0 đến 7,5. Dung dịch đệm WB2-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 2.

WB1-2 chỉ dung dịch đệm rửa 1-2, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5, sau đó bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M. Để ổn định, dung dịch đệm WB1-2 này được bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60% trước khi sử dụng làm dung dịch để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 1;

WB2-2 chỉ dung dịch đệm rửa 2-2, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM

đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5. Dung dịch đệm WB2-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 2.

EB1 chỉ dung dịch đệm đẩy 1, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách hòa tan EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,0 đến 9,0. Dung dịch đệm EB1 này được dùng để đẩy ADN ra khỏi hạt MagSi.

EB2 chỉ dung dịch đệm đẩy 2, trong đó dung dịch này được tạo ra bằng cách xử lý nước cất bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), chỉnh pH từ 6,0 đến 6,5. Dung dịch đệm EB2 này được dùng để đẩy ARN ra khỏi hạt MagSi.

Theo đó, kit theo giải pháp hữu ích thích hợp để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để chẩn đoán bệnh ung thư.

Ngoài ra, kit theo giải pháp hữu ích còn có thêm hướng dẫn sử dụng để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để chẩn đoán bệnh ung thư.

Quy trình sản xuất kit theo giải pháp hữu ích bao gồm các công đoạn: a) tạo hạt MagSi nano bọc silica; b) tạo 10 dung dịch đệm; và c) tạo kit.

Trong công đoạn tạo hạt MagSi nano bọc silica, công đoạn này bao gồm các bước: tạo hạt nano oxit sắt từ, thu hạt nano oxit sắt từ, và thu hạt MagSi nano bọc silica.

Trong bước tạo hạt nano oxit sắt từ, $FeCl_2.4H_2O$ và $FeCl_3.6H_2O$ lần lượt được hòa tan bằng nước đến nồng độ từ 0,4 đến 4% và khuấy đều trong khoảng từ 20 đến 30 phút. Tiếp đến, phối trộn hai dung dịch này theo tỷ lệ trọng lượng $FeCl_2.4H_2O/FeCl_3.6H_2O$ từ 1/2 đến 1/3 (w/w). Tiếp đến gia nhiệt dung dịch chứa ion sắt này đến nhiệt độ khoảng từ 50 đến 70°C. Đồng thời, dung dịch NH_4OH nồng độ khoảng từ 5 đến 15% cũng được gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng từ 50 đến 70°C và bổ sung từ từ vào dung dịch chứa ion sắt trên theo tỷ lệ thể tích từ 1/3 đến 1/4 (w/w) để phản ứng tạo mầm kết tủa hạt nano oxit sắt xảy ra. Tiếp đến tiến hành khuấy trộn đều trong khoảng từ 30 đến 40 phút để phản ứng tạo mầm hạt nano xảy ra và kết tủa thành các hạt nano oxit sắt kích thước cỡ nano. Các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng, việc phối trộn $FeCl_2.4H_2O$ và $FeCl_3.6H_2O$ theo tỷ lệ nêu trên cùng với việc sử dụng dụng dịch NH_4OH nồng độ khoảng từ 5 đến 15% trong điều kiện phản ứng ở nhiệt độ

khoảng từ 50 đến 70°C cho phép thu được các hạt oxit sắt có kích thước đồng đều khoảng từ 20 đến 40 nm. Kích thước này giúp tăng hiệu quả chiết và tinh sạch ADN hoặc ARN ra khỏi mẫu.

Trong bước thu hạt nano oxit sắt, tác dụng một từ trường lên dung dịch chứa hạt nano oxit sắt (Fe_3O_4) trong thời gian từ 5 đến 15 phút. Từ trường này có thể là từ trường của nam châm điện, nam châm vĩnh cửu hoặc từ điện trường. Từ trường này cần đủ mạnh để hút các hạ nano tụ xuống để hút, loại bỏ phần dịch trong quá trình rửa. Sau khi loại bỏ phần dịch, ngắt từ trường và bổ sung nước cất để rửa, tiếp đó tác dụng từ trường từ 5 đến 15 phút để tụ hạt nano và loại bỏ nước. Quá trình rửa này được lặp lại từ 5 đến 10 lần, thu được hạt nano oxit sắt từ sạch. Việc tác dụng từ trường vào hạt nano và ngắt từ trường trong thời gian từ 5 đến 15 phút cùng với việc rửa bằng nước giúp loại bỏ các hạt không nhiễm từ, nhằm thu được lượng hạt nano sạch là oxit sắt từ, các hạt này nhiễm từ khi đặt trong từ trường.

Trong bước thu hạt MagSi nano bọc silica, tiến hành rửa lại hạt nano oxit sắt từ thu được ở trên bằng cồn, sau đó pha với dung dịch cồn theo tỷ lệ từ 1 đến 2% (g/ml). Tiếp đó, bổ sung khoảng từ 5 đến 20% dung dịch bao gồm NH_4OH 25% đã pha với tetraethyl orthosilicat (TEOS) theo tỷ lệ 50/50 (w/w). Dung dịch này cho phép tạo ra được lớp silica bọc bên ngoài hạt nano oxit sắt từ. Sau khi bổ sung khoảng 10 đến 30% nước cất và để hỗn dịch này trong bể siêu âm với tần số từ 30 đến 40 kHz trong thời gian từ 1 đến 2 giờ thu được hạt nano sắt từ được bọc lớp silica SiO_2 dày khoảng từ 2 đến 5nm. Hạt nano oxit sắt từ được bọc lớp silica này được lọc rửa bằng nước cất thu được hạt MagSi nano bọc silica kích thước từ 30-50nm có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g. Bằng cách sử dụng kỹ thuật siêu âm với dung dịch NH_4OH 25% đã pha với tetraethyl orthosilicat, có thể tạo ra được lớp phủ đều trên từng lõi hạt nano oxit sắt từ, không bị kết tụ hoặc tạo khối hạt nano lớn với kích thước micro. Kỹ thuật này cho phép thu được hạt MagSi nano bọc silica kích thước từ 30-50nm đồng đều có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g thích hợp sử dụng làm chất mang gắn ADN và/hoặc ARN đặc hiệu.

Trong công đoạn tạo 10 dung dịch đệm, công đoạn này bao gồm các bước: tạo dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica (MagSi); tạo dung dịch đệm phân giải (BL); tạo dung dịch đệm liên kết 1 (BB1); tạo dung dịch đệm liên kết 2 (BB2); tạo dung dịch đệm rửa 1-1 (WB1-1); tạo dung dịch đệm rửa 2-1 (BB2-1); tạo dung dịch

đệm rửa 1-2 (WB1-2); tạo dung dịch đệm rửa 2-2 (WB2-2); tạo dung dịch đệm đẩy 1 (EB1); và tạo dung dịch đệm đẩy 2 (EB2). Công đoạn này bao gồm các bước được thực hiện độc lập nhau, do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, các bước này có thể thực hiện tùy ý mà không phải theo thứ tự như được mô tả ở đây, miễn là thu được 10 dung dịch đệm theo yêu cầu.

Trong bước tạo dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica (MagSi), hạt MagSi nano bọc silica thu được ở trên được chuẩn hóa trước khi sử dụng, nghĩa là định lượng để đạt nồng độ pha kiểm soát được. Cụ thể là hạt MagSi nano bọc silica có thể được định lượng và pha với dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7 đến nồng độ 50 mg/ml. Sau khi trộn đều để các hạt này phân tán đồng đều, thu được dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g. Dung dịch đệm MagSi này được dùng để liên kết đặc hiệu với ADN và ARN.

Trong bước tạo dung dịch đệm phân giải (LB), tiến hành bổ sung lần lượt natri dodecyl sulphat (SDS) nồng độ từ 0,2 đến 2%, canxi clorua nồng độ từ 1 mM đến 5 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7,0 đến 9,0 trộn đều. Các muối này được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm, có thể tiến hành lọc để loại bỏ phần không tan. Dung dịch đệm LB thu được đồng nhất và được dùng kết hợp với enzym proteaza ở nhiệt độ và thời gian thích hợp có tác dụng phá vỡ khối mô vùi trong parafin, giải phóng ARN và ADN.

Trong bước tạo dung dịch đệm liên kết 1 (BB1), tiến hành bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, kali axetat nồng độ từ 0,2 M đến 0,8 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 4,0 đến 5,0 trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Các muối này được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm, có thể tiến hành lọc để loại bỏ phần không tan. Dung dịch đệm BB1 này thu được đồng nhất và có tác dụng tạo môi trường thuận lợi để liên kết một cách chọn lọc ADN hệ gen với SiO_2 của hạt MagSi. Theo một phương án ưu tiên, muối được sử dụng là muối guanidin thiocyanat nồng độ từ 2 M đến 5 M. Theo một phương án ưu tiên khác, muối được sử dụng là muối guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M.

Trong bước tạo dung dịch đệm liên kết 2 (BB2), tiến hành bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, natri xitrat nồng độ từ

0,05 M đến 0,2 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 6,5 đến 8,0 và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Các muối này được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm, có thể tiến hành lọc để loại bỏ phần không tan. Dung dịch đệm BB2 này thu được đồng nhất và có tác dụng tạo môi trường thuận lợi để liên kết một cách chọn lọc ARN và ARN hệ gen với SiO_2 của hạt MagSi. Theo một phương án ưu tiên, muối được sử dụng là muối guanidin thiocyanat nồng độ từ 2 M đến 5 M. Theo một phương án ưu tiên khác, muối được sử dụng là muối guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M.

Trong bước tạo dung dịch đệm rửa 1-1 (WB1-1), tiến hành bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 50 mM, pH từ 6,0 đến 7,5 và trộn đều để thu được dung dịch đồng nhất. Để ổn định mẫu, bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%. Các muối này được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm, có thể tiến hành lọc để loại bỏ phần không tan. Dung dịch đệm WB1-1 này thu được đồng nhất có tác dụng rửa, loại bỏ các thành phần không phải là axit nucleic bám không đặc hiệu với hạt MagSi và được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi sau khi đã liên kết ADN lên hạt MagSi. Theo một phương án ưu tiên, muối được sử dụng là muối guanidin thiocyanat nồng độ từ 1 M đến 3 M. Theo một phương án ưu tiên khác, muối được sử dụng là muối guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M.

Trong bước tạo dung dịch đệm rửa 2-1 (WB2-1), tiến hành hòa tan natri clorua nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 20 mM, pH từ 6,0 đến 7,5 để thu được dung dịch đồng nhất. Dung dịch đệm WB2-1 này có tác dụng rửa, loại bỏ hoàn toàn guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit còn sót lại sau khi rửa bằng dung dịch đệm WB1-1. Theo cách khác, dung dịch đệm WB2-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 2.

Trong bước tạo dung dịch đệm rửa 1-2 (WB1-2), tiến hành hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5. Tiếp đó, hòa tan guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M để tạo dung dịch đồng nhất. Để ổn định, tiến hành bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%. Các muối này được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch đệm, có thể tiến hành lọc để loại bỏ phần

không tan. Dung dịch đệm WB1-2 này thu được đồng nhất có tác dụng rửa, loại bỏ các thành phần không phải là axit nucleic bám không đặc hiệu với hạt MagSi và được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi sau khi đã liên kết ARN lên hạt MagSi. Theo một phương án ưu tiên, muối được sử dụng là muối guanidin thiocyanat nồng độ từ 1 M đến 3 M. Theo một phương án ưu tiên khác, muối được sử dụng là muối guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M.

Trong bước tạo dung dịch đệm rửa 2-2 (WB2-2), tiến hành hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5. Dung dịch đệm WB2-2 này có tác dụng rửa, loại bỏ hoàn toàn guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit còn sót lại sau khi rửa bằng dung dịch đệm WB1-2 được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi sau khi đã được rửa bằng dung dịch đệm WB1-2 để thu ARN trong quá trình chiết. Theo cách khác, dung dịch đệm WB2-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 2.

Trong bước tạo dung dịch đệm đẩy 1 (EB1), tiến hành hòa tan EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,0 đến 9,0 để thu được dung dịch đồng nhất. Dung dịch đệm EB1 này được dùng để đẩy ADN ra khỏi hạt MagSi. Cụ thể là trong quá trình chiết ADN, sau khi ADN được rửa bằng phức hệ WB2-1 thu được các hạt MagSi gắn ADN, khi đó sử dụng dung dịch đệm đẩy EB1 này để tách ADN ra khỏi hạt MagSi để thu được ADN tinh sạch.

Trong bước tạo dung dịch đệm đẩy 2 (EB2), tiến hành bằng cách xử lý nước cất bằng diethylpyrocarbonat (DEPC). Quy trình xử lý nước cất này theo quy trình chuẩn đã được đề cập. Sau đó, chỉnh pH của nước cất từ 6,0 đến 6,5 để thu được dung dịch đồng nhất. Dung dịch đệm EB2 này được dùng để đẩy ARN ra khỏi hạt MagSi, cụ thể là trong quá trình chiết ARN, sau khi rửa phức hệ ARN-MagSi bằng dung dịch WB2-2 thu được các hạt Mag gắn ARN, khi đó sử dụng dung dịch đệm EB2 để tách ARN ra khỏi hạt MagSi để thu được ARN tinh sạch.

Trong công đoạn tạo kit, 10 dung dịch thu được ở trên được đóng lọ và tạo kit với các thành phần và định lượng như sau:

stt	Thành phần	Ký hiệu	Định lượng (ml/lọ)	Số lượng (lọ)
1	Dung dịch đệm chứa hạt MagSi	MagSi	1.8	3
2	Dung dịch đệm phân giải	LB	20	1
3	Dung dịch đệm liên kết 1	BB1	40	1
4	Dung dịch đệm liên kết 2	BB2	40	1
5	Dung dịch đệm rửa 1-1	WB1-1	30	1
6	Dung dịch đệm rửa 2-1	WB2-1	30	1
7	Dung dịch đệm rửa 1-2	WB1-2	100	1
8	Dung dịch đệm rửa 2-2	WB2-2	100	1
9	Dung dịch đệm đẩy 1	EB1	20	1
10	Dung dịch đệm đẩy 2	EB2	20	1.

Các lọ trong kit này còn được dãn nhãn cho từng lọ, tiếp đó đóng gói kit cùng hướng dẫn sử dụng kit để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư. Quy trình chiết ADN và/hoặc ARN bằng kit theo giải pháp hữu ích được thực hiện theo hướng dẫn được nêu bên dưới.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết ADN và/hoặc ARN bằng kit theo giải pháp hữu ích để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư. Theo đó, kit theo giải pháp hữu ích có thể được sử dụng để chiết ADN, ARN hoặc đồng thời cả ADN và ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin.

Quy trình chiết AND từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bằng kit theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

a) Dung giải tế bào mô bằng cách bổ sung 200 µl dung dịch LB vào ống chứa mẫu mô vùi parafin và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phần lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ trong khoảng từ 56^{o}C đến 60^{o}C trong 60 phút, tiếp đến ủ mẫu ở 90^{o}C trong 60 phút để dung giải tế bào;

b) Gắn ADN lên hạt MagSi bằng cách bổ sung 400 µl đệm BB1, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10-15 giây, sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút để gắn ADN lên hạt MagSi nano;

c) Thu hạt MagSi-ADN bằng cách đặt ống mẫu lên giá từ để tập trung hạt từ trong khoảng từ 30 giây đến 60 giây hoặc tới khi dịch trở nên trong, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl đệm WB1-1 đảo trộn đều, sau khi đặt lên giá từ, loại bỏ đệm WB1-1, bổ sung 800 µl đệm WB2-1 và đặt lên giá từ loại bỏ đệm WB2-1 thu được hạt MagSi-ADN;

d) Thu ADN bằng cách bổ sung 200 µl đệm EB1 và trộn đều mẫu trong khoảng từ 10 giây đến 15 giây, sau khi ủ mẫu ở 60°C trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút, hút phần dịch thu được ADN tinh sạch.

Quy trình chiết ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bằng kit theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

a) Dung giải tế bào mô bằng cách bổ sung 200 µl dung dịch LB vào ống chứa mẫu mô vùi parafin và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phân lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ trong khoảng từ 56°C đến 60°C trong 15 phút, tiếp đến ủ mẫu ở 80°C trong 30 phút để dung giải tế bào;

b) Gắn ARN lên hạt MagSi bằng cách bổ sung 400 µl đệm BB2, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10-15 giây, sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút để gắn ARN lên hạt MagSi nano;

c) Thu hạt MagSi-ARN bằng cách đặt ống mẫu lên giá từ để tập trung hạt từ trong khoảng từ 30 giây đến 60 giây hoặc tới khi dịch trở nên trong, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl đệm WB1-2 đảo trộn đều, sau khi đặt lên giá từ, loại bỏ đệm WB1-2, bổ sung 800 µl đệm WB2-2 và đặt lên giá từ loại bỏ đệm WB2-2 thu được hạt MagSi-ARN;

d) Thu ARN bằng cách bổ sung 200 µl đệm EB1 và trộn đều mẫu trong khoảng từ 10 giây đến 15 giây, sau khi ủ mẫu ở 60°C trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút, hút phần dịch thu được ARN tinh sạch.

Quy trình chiết ARN và ADN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin bằng kit theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

a) Dung giải tế bào mô bằng cách bổ sung 200 µl dung dịch LB vào ống chứa mẫu mô vùi parafin và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phân lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ trong khoảng từ 56^{o}C đến 60^{o}C trong 15 phút, tiếp đến ủ mẫu ở 80^{o}C trong 30 phút để dung giải tế bào;

b) Gắn ADN và ARN lên hạt MagSi bằng cách bổ sung 200 µl đệm BB1 và 200 µl đệm BB2, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10-15 giây, sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút để gắn ADN và ARN lên hạt MagSi nano;

c) Thu hạt MagSi-ADN/ARN bằng cách đặt ống mẫu lên giá từ để tập trung hạt từ trong khoảng từ 30 giây đến 60 giây hoặc tới khi dịch trở nên trong, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl đệm WB1-2 đảo trộn đều, sau khi đặt lên giá từ, loại bỏ đệm WB1-2, bổ sung 800 µl đệm WB2-2 và đặt lên giá từ loại bỏ đệm WB2-2 thu được hạt MagSi-ADN/ARN;

d) Thu ADN và ARN bằng cách bổ sung 200 µl đệm EB1 và trộn đều mẫu trong khoảng từ 10 giây đến 15 giây, sau khi ủ mẫu ở 60^{o}C trong khoảng từ 2 phút đến 3 phút, hút phần dịch thu được ADN và ARN tinh sạch.

Theo đó, việc chiết tách ARN và/hoặc ARN được thực hiện bằng giá từ cho phép tự động hóa quy trình chiết, bằng cách bắt giữ chọn lọc các hạt nano từ nên việc chiết ADN và/hoặc ARN hiệu quả và có khả năng chiết được với mẫu có lượng ADN và/hoặc ARN thấp.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất hạt MagSi nano bọc silica

Để sản xuất khoảng 1g hạt MagSi nano bọc silica, tiến hành hòa tan lần lượt 0,858g muối sắt FeCl2.4H20 và 1,866 g muối sắt $FeCl_3.6H_20$ vào 100 ml nước cất. Khuấy đều dung dịch này trong 20 phút. Tiếp đó trộn đều hai dung dịch này thành 200 ml dung dịch muối sắt đồng nhất và gia nhiệt đến nhiệt độ 60^{o}C.

Hòa tan 30 ml dung dịch NH_4OH 25% vào 30 ml nước cất để tạo thành dung dịch đồng nhất, sau đó gia nhiệt dung dịch này đến 60°C và bổ sung vào 200 ml dung dịch muối sắt nêu trên. Sau đó tiến hành khuấy trộn đều trong 30 phút để phản ứng tạo mầm và kết tủa hạt nano xảy ra, thu được 260 ml dung dịch chứa hạt nano oxit sắt. Sau đó chuyển bình phản ứng này lên trên thanh nam châm để tác dụng từ lên dịch chứa hạt nano oxit sắt từ (Fe_3O_4) trong 15 phút để hạt nano trong dung dịch tụ xuống dưới đáy bình. Sau khi oại bỏ phần dịch, lấy bình phản ứng ra khỏi nam châm và bổ sung 100 ml nước và khuấy trộn đều, sau đó chuyển bình phản ứng này lên thanh nam châm trong 15 phút để kết tụ các hạt nano xuống đáy bình và loại bỏ nước. Lặp lại quá trình rửa này 10 lần, thu được khoảng 1g hạt nano oxit sắt.

Tiến hành rửa hạt nano oxit sắt thu được ở trên bằng 50 ml cồn etanol bằng phương pháp như rửa bằng nước, sau đó pha chuẩn 1g hạt nano oxit sắt được hòa trong 100 ml cồn etanol để tạo dung dịch 1% hạt nano oxit sắt. Tiếp đó trộn đều với dung dịch bao gồm 10 ml NH_4OH 25% pha với 10 ml tetraethyl orthosilicat (TEOS) và bổ sung 30ml nước cất và chuyển hỗn dịch này vào trong bể siêu âm. Chỉnh tần số siêu âm đến 40 kHz và giữ trong 2 giờ để phản ứng bọc silica lên lõi hạt nano oxit sắt xảy ra. Tiếp đó lọc và rửa bằng nước cất thu được hạt MagSi nano bọc silica kích thước từ 30-50nm có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g. Hạt MagSi nano bọc silica này được chuẩn độ đến 25mg/ml bằng nước cất để bảo quản trước khi tạo dung dịch đệm.

Ví dụ 2: Sản xuất kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin

Để sản xuất kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin, tiến hành thực hiện với kit sử dụng cho 100 phản ứng chiết. Tiến hành pha chế 10 dung dịch đệm như sau:

Lấy 11ml dung dịch chứa hạt MagSi nano bọc silica đã được chuẩn độ đến 25 mg/ml, sau khi loại bỏ nước và pha với dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH 6, đến nồng độ 50 mg/ml. Dung dịch này được trộn đều trong 3 phút, thu được 5,4 ml dung dịch đệm chứa 270 mg hạt MagSi nano bọc silica có độ từ hóa từ 55 emu/g. Chia 5,4 ml dung dịch đệm MagSi này vào 3 lọ kín dung tích 2ml, mỗi lọ chứa 1,8ml dung dịch đệm chứa hạt MagSi, ký hiệu MagSi.

Pha 5 mg muối canxi clorua và 1g natri dodecyl sulphat (SDS) vào 5 ml dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 50mM, chỉnh pH=8 và trộn đều, tiếp đó bổ sung nước cất khử ion để thu được 20ml đệm LB. Dung dịch đệm LB này được đóng vào lọ kín dung tích 20ml, ký hiệu LB.

Hòa tan 8g guanidin hydrochlorit và 2g kali axetat trong 2 ml đệm Tris-HCl, tiếp đó chỉnh pH=7 và bổ sung 2ml EDTA nồng độ 500mM và trộn đều. Cuối cùng bổ sung nước khử ion để thu được 40 ml đệm BB1. Dung dịch đệm BB1 này được đóng vào trong lọ kín dung tích 40ml, ký hiệu BB1.

Hòa tan 8g guanidin hydrochlorit và 2g kali axetat trong 2 ml đệm Tris-HCl, tiếp đó chỉnh pH=7 và bổ sung 3ml EDTA nồng độ 500mM và trộn đều. Cuối cùng bổ sung nước khử ion để thu được 40 ml đệm BB2. Dung dịch đệm BB2 này được đóng vào trong lọ kín dung tích 40ml, ký hiệu BB2.

Hòa tan 15g guanidin hydrochlorit và 5g natri clorua vào 5ml dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 1M, trộn đều, sau đó chỉnh đến pH=6 và bổ sung 60 ml etanol 96° và trộn đều. Cuối cùng bổ sung nước cất đến khi đạt đủ 100 ml. Thu được 100 ml dung dịch đệm WB1-1. Dung dịch đệm WB1-1 được đóng vào lọ kín dung tích 100 ml, ký hiệu WB1-1.

Hòa tan 15g guanidin hydrochlorit và 5g natri clorua vào 5ml dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 1M, trộn đều, sau đó chỉnh đến pH=6 và bổ sung 60 ml etanol 96° và trộn đều. Cuối cùng bổ sung nước cất đến khi đạt đủ 100 ml. Thu được 100 ml dung dịch đệm WB1-1. Dung dịch đệm WB1-1 được đóng vào lọ kín dung tích 100 ml, ký hiệu WB1-1.

Hòa tan 1g natri clorua trong 2ml dung dịch đệm Tris-HCl 1M, pH 6, sau đó bổ sung thêm nước cất khử ion đến thể tích 30 ml, sau đó bổ sung etanol 96° đủ 100ml thu được 100 ml dung dịch đệm WB2-1. Dung dịch đệm WB2-1 này được đóng vào lọ kín dung tích 100 ml, ký hiệu WB2-1.

Hòa tan 1g natri xitrat và 100 mg axit xitric trong nước để tạo đệm xitrat nồng độ 20mM, pH=6. Tiếp đó hòa 15g guanidin hydrochlorit với 50ml nước cất khử ion . cuối cùng bổ sung etanol 96° đủ 100 ml và trộn đều, thu được 100 ml dung dịch đệm WB1-2. Dung dịch đệm WB1-2 này được đóng vào lọ kín dung tích 100 ml, ký hiệu WB1-2.

Hòa tan 1g natri xitrat và 100 mg axit xitric trong 100 ml nước cất để thu được 100 ml dung dịch đệm WB2-2. Dung dịch đệm WB2-2 này được đóng vào lọ kín dung tích 100 ml, ký hiệu WB2-2.

Trộn 6ml dung dịch Tris-HCl nồng độ 100mM, pH= 8 với 2ml EDTA nồng độ 20mM có pH=8. Cuối cùng bổ sung nước cất đủ 20 ml. Dung dịch đệm EB1 này được đóng vào lọ kín dung tích 20ml, ký hiệu EB1.

Xử lý 20ml nước cất bằng diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,1%, chỉnh pH = 6,0, thu được 20ml dung dịch đệm EB2. Dung dịch đệm EB2 này được đóng vào lọ kín dung tích 20ml, ký hiệu EB2.

Các lọ trên (12 lọ) được dán nhãn và đóng hộp cùng với hướng dẫn hướng dẫn sử dụng kit để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư để tạo thành kit hoàn chỉnh.

Ví dụ 3: Thử nghiệm chiết ADN từ mẫu mô ung thư đại trực tràng và ung thư vòm họng bằng kit theo giải pháp hữu ích

Mẫu mô ung thư tuyến giáp và mẫu mô ung thư vòm họng của bệnh nhân ung thư tuyến giáp và ung thư vòm họng được xử lý bằng formalin vùi trong parafin được cung cấp từ bệnh viện và được sử dụng làm mẫu thử nghiệm chiết ADN bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Mẫu mô vùi trong parafin được cắt theo định lượng chuẩn cho vào ống xử lý, bổ sung 200 µl dung dịch LB và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phần lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ ở 60^{o}C trong 60 phút, tiếp đến gia nhiệt lên 90^{o}C trong 60 phút để dung giải tế bào.

Bổ sung 400 µl đệm BB1, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10 giây, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 phút để gắn ADN lên hạt MagSi nano. Tiếp đến, đưa mẫu này lên giá từ để tập trung hạt từ trong 60 giây để dịch trở nên trong, phần hạt được tụ xuống bên dưới. Sau đó, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl đệm WB1-1 và trộn đều và chuyển lên giá từ để kết tụ hạt và loại bỏ đệm WB1-1. Tiếp đến, bổ sung 800 µl đệm WB2-1 và đặt lên giá từ và loại bỏ đệm WB2-1.

Bổ sung tiếp 200 µl đệm EB1 vào mẫu và trộn đều mẫu trong 10 giây rồi ủ mẫu ở 60^{o}C trong 3 phút, hút phần dịch chứa ADN tinh sạch.

Để kiểm tra chất lượng ADN thu được, sử dụng mẫu ADN thu được ở trên để dùng làm khuôn sử dụng trong phản ứng PCR và giải trình tự gen. Phản ứng PCR nhằm nhân đoạn ADN có kích thước 250 bp đặc hiệu cho đoạn gen *Braf*. Thành phần master mix của một phản ứng bao gồm 6 µl $MgCl_2$ 25 mM, 5 µl Go-Bufer 10X, 0.2 µl Go-Taq polymeraza (của hãng Promega, Hoa Kỳ) 2,5 µl dNTPs (Ferments, Hoa Kỳ), 1 µl mồi xuôi Braf Fw và 1 µl mồi ngược Braf Rv (IDT, Hoa Kỳ), nước cất khử trùng được đủ 22 µl, mẫu sử dụng 3 µl ADN thu được ở trên.

Tiến hành PCR với 40 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. Kết quả phân tích trên gel agaroza 2% sử dụng thang chuẩn ADN 100 bp được thể hiện trên Hình 1. Kết quả giải trình tự được thể hiện trên Hình 2.

Theo Hình 1 cho thấy, các băng số 4-5 có độ sáng, rõ nét và có kích thước khoảng 250 bp phù hợp lý thuyết. Điều này cho thấy rằng kit theo giải pháp hữu ích có khả năng chiết ADN của mô ung thư với nồng độ và độ tinh sạch bảo đảm chất lượng cho phản ứng PCR. Hình 2 cũng cho thấy sản phẩm PCR có thể sử dụng làm khuôn để giải trình tự ADN của gen *Braf* với các peak A, T, C, G rõ nét.

Ví dụ 4: Thử nghiệm chiết ARN từ mẫu mô ung thư tuyến giáp bằng kit theo giải pháp hữu ích

Mẫu mô ung thư tuyến giáp từ bệnh nhân được xử lý bằng formalin vùi trong parafin được cung cấp từ bệnh viện và được sử dụng làm mẫu thử nghiệm chiết ARN bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Mẫu mô vùi trong parafin được cắt theo định lượng chuẩn cho vào ống xử lý, bổ sung 200 µl dung dịch LB và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phần lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ ở 60°C trong 60 phút, tiếp đến gia nhiệt lên 90°C trong 60 phút để dung giải tế bào.

Bổ sung 400 µl đệm BB2, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10 giây, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 phút để gắn ADN lên hạt MagSi nano. Tiếp đến, đưa mẫu này lên giá từ để tập trung hạt từ trong 60 giây để dịch trở nên trong, phần hạt được tụ xuống bên dưới. Sau đó, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl

đệm WB1-2 và trộn đều và chuyển lên giá từ để kết tụ hạt và loại bỏ đệm WB1-2. Tiếp đến, bổ sung 800 µl đệm WB2-2 và đặt lên giá từ và loại bỏ đệm WB2-2.

Bổ sung tiếp 200 µl đệm EB1 vào mẫu và trộn đều mẫu trong 10 giây rồi ủ mẫu ở 60°C trong 3 phút, hút phần dịch chứa ARN tinh sạch.

Để kiểm tra chất lượng ARN thu được, tiến hành kiểm tra realtime-PCR với đò Taqman để nhân đoạn gen GAPDH có kích thước 199 bp. Thành phần master mix của một phản ứng TOPreal™ One-step RT qPCR kit (dò *TaqMan*) 5X (của hãng Enzynomics, Hàn Quốc), 5 µM mồi xuôi GAPDH Fw, 5 µM mồi ngược GAPDH Rv và 1µM probe GAPDH cho tín hiệu huỳnh quang HEX (IDT, Hoa Kỳ), nước cất vừa đủ 20 µl. Sử dụng 5 µl ARN mẫu thu được ở trên cho mỗi ống phản ứng. Tiến hành phản ứng với 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm bước tạo cDNA ở 50°C trong 30 phút, biến tính khởi động ở 94°C trong 10 phút, biến tính ADN ở 94°C trong 10 giây, bước gắn mồi và kéo dài ở 60°C trong 1 phút.

Kết quả phân tích được thể hiện trên Hình 3. Theo đó cho thấy phản ứng realtime- PCR đã nhân thành công ARN chiết từ tiêu bản cố định mô ung thư của 3 bệnh nhân khác nhau bằng kit theo giải pháp hữu ích. Cả 3 đường biểu diễn khuếch đại cho đường cong rõ ràng, cho tín hiệu huỳnh quang tốt. Điều này chứng minh rằng kit theo giải pháp hữu ích chiết được ARN từ mẫu mô với nồng độ và độ tinh sạch bảo đảm chất lượng cho phản ứng PCR.

Ví dụ 5: Kiểm tra tính ổn định và hiệu quả của kit chiết ARN và ADN

Trong thử nghiệm này, tiến hành đánh giá hiệu quả chiết ADN và ARN từ mẫu đối với kit và tính ổn định của kit bảo quản trong điều kiện môi trường (gọi là SC) so với kit thương mại MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kit của hãng Life Technology (gọi là MMax). Đối chứng dương (ĐC+) và đối chứng âm (ĐC-) được tiến hành với mẫu trắng và mẫu chứa gen của virut EBV và HPV tương ứng.

Kit theo giải pháp hữu ích được sản xuất và bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong 3 tháng trước khi sử dụng trong thử nghiệm. Kit thương mại được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Năm mẫu mô ung thư tuyến giáp từ 5 bệnh nhân khác nhau được xử lý bằng formalin vùi trong parafin được cung cấp từ bệnh viện và được sử dụng làm mẫu thử nghiệm chiết ADN và ARN bằng kit theo giải pháp hữu ích.

Mẫu mô vùi trong parafin được cắt theo định lượng chuẩn cho vào ống xử lý, bổ sung 200 µl dung dịch LB và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 giây, thu phần lớp bên dưới chứa mô ngâm trong đệm LB, sau đó bổ sung 20 µl proteinaza K, trộn đều và ủ ở 60°C trong 60 phút, tiếp đến gia nhiệt lên 90°C trong 60 phút để dung giải tế bào.

Bổ sung 200 µl đệm BB1, 200 µl đệm BB2, 200 µl isopropanol, 50 µl đệm MagSi vào ống chứa mẫu, trộn đều trong 10 giây, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 phút để gắn ADN và ARN lên hạt MagSi nano. Tiếp đến, đưa mẫu này lên giá từ để tập trung hạt từ trong 60 giây để dịch trở nên trong, phần hạt được tụ xuống bên dưới. Sau đó, loại bỏ dịch và bổ sung 600 µl đệm WB1-2 và trộn đều và chuyển lên giá từ để kết tụ hạt và loại bỏ đệm WB1-2. Tiếp đến, bổ sung 800 µl đệm WB2-2 và đặt lên giá từ và loại bỏ đệm WB2-2.

Bổ sung tiếp 200 µl đệm EB1 vào mẫu và trộn đều mẫu trong 10 giây rồi ủ mẫu ở 60°C trong 3 phút, hút phần dịch chứa ADN và ARN tinh sạch.

Tiến hành chiết ADN và ARN bằng kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng và chất lương ADN tách chiết từ 2 bộ kit sẽ được đánh giá so sánh bằng hệ thống đo quang phổ và realtime-PCR để nhân đoạn gen đặc hiệu cho virut EBV và HPV là 2 đối tượng nghiên cứu ở các bệnh nhân ung thư vòm họng. Kết quả so sánh độ tinh sạch của các mẫu ADN chiết bởi 2 bộ kit được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả so sánh hiệu quả chiết ADN và ARN từ kit thử nghiệm

Stt mẫu	Nồng độ ADN và ARN (ng/ml)		Chu kỳ ngưỡng (C_t) tín hiệu FAM (EBV)		Chu kỳ ngưỡng (C_t) tín hiệu HEX β-globin		Chu kỳ ngưỡng (C_t) tín hiệu SBGR Green (HPV)	
	SC	MMax	SC	MMax	SC	MMax	SC	MMax
1	32,80	9,20	25	28,5	25	31	12,0	25,0
2	70,00	10,35	28	31,5	28,5	32,5	16,0	26,0
3	42,20	7,60	27,5	30	25	29	NA	NA
4	43,05	6,60	29	32,5	27	33	NA	NA
5	50,60	15,50	30	36	27,5	35,5	NA	NA
ĐC+	-	-	27,5		27		23	
ĐC-	-	-	NA		26		NA	

NA: không phát hiện được

Kết quả trên cho thấy rằng, kit theo giải pháp hữu ích hoạt động ổn định, có hiệu quả chiết ADN và ARN vượt trội so với kit thương mại, vốn sử dụng các hạt từ có kích thước micro và sử dụng hệ đệm gắn, hệ đệm rửa khác. Kết quả chiết bằng kit theo giải pháp hữu ích thu được ADN và ARN cao hơn từ 3 đến 6 lần so với kit thương mại, điều này cho phép thu được ngưỡng phát hiện thấp hơn, giúp phát hiện bệnh sớm, đặc biệt với những mẫu ung thư giai đoạn đầu, vốn có mức độ đột biến rất thấp. Kết quả này đặc biệt có ý nghĩa trong việc sàng lọc và chẩn đoán sớm bệnh ung thư.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin cho phép chiết được đồng thời hoặc riêng lẻ từng thành phần ADN hoặc ARN một cách đặc hiệu, bằng cách không sử dụng enzym ADNaza hoặc ARNaza, kit cho phép chiết với hiệu suất cao, giúp cho quá trình phát hiện, chẩn đoán bệnh được hiệu quả hơn. Ngoài ra, kit theo giải pháp hữu ích có độ ổn định, tiện lợi để sử dụng trong chiết ADN và/hoặc ARN mà không cần nhiều công đoạn pha chế phức tạp.

Việc sử dụng kỹ thuật bọc silica lên lõi hạt nano sắt từ với kích thước xác định được điều chỉnh thông qua nồng độ và điều kiện các chất phản ứng cùng với việc sử dụng kỹ thuật tạo hạt mầm hạt nano từ Fe_3O_4 có kích thước nhỏ và từ độ cao trong điều kiện đồng kết tủa ở nhiệt độ từ 50°C đến 70°C và bọc bọc lớp silica bằng hỗn hợp có 2 thành phần NH_4OH và TEOS trong điều kiện siêu âm tần số 30 kHz - 40khz cho phép tạo ra lớp silica bọc kín trên bề mặt hạt MagSi nano với chiều dày lớp bọc đồng đều, giúp hạt phân tán tốt hơn, kích thước hạt đồng đều hơn, nhưng không bị kết tụ nếu không có từ trường, điều này tạo tiền đề làm giá hấp thụ ADN và ARN trong quá trình chiết, từ đó nâng cao hiệu quả chiết.

Cùng với việc sử dụng các đệm hấp thụ, đệm rửa và các hạt MagSi từ có kích thước phù hợp giúp tăng diện tích bề mặt tổng cộng tương tác với ADN/ARN, tăng lượng ADN/ARN gắn kết lên hạt cũng như ưu tiên gắn ADN và/hoặc ARN lên hạt thông qua các đệm liên kết có tính chất ưu tiên hoặc gắn ADN hoặc ARN lên hạt với ái lực mạnh, trong trường hợp gắn đồng thời ADN và ARN, sử dụng đệm BB1 kết hợp cùng các bộ đệm rửa và chiết đẩy ưu tiên cho RNA. Các đệm WB được bổ sung NaCl nồng độ từ 0,5 M đến 1 M giúp cho ADN và ARN không bị bong ra khi rửa mẫu.

Đệm EB có pH trong khoảng 7,0 đến 9,0 cho phép chiết đẩy ADN hiệu quả. Tất cả các điều chỉnh này cho phép tăng được nồng độ ADN và/hoặc ARN chiết cao hơn so với kit thương mại, sử dụng hạt kích thước micro, từ 3 đến 6 lần. Đây là một kết quả rất có ý nghĩa trong việc chẩn đoán các bệnh ung thư giai đoạn sớm.

Kit theo giải pháp hữu ích cho phép chiết đồng thời hoặc riêng lẻ ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin một cách tự động với nhiều mẫu đồng thời, điều này giúp giảm giá thành, rút ngắn thời gian cũng như tăng hiệu quả xét nghiệm và loại bỏ được những sai sót do chiết ADN và/hoặc ARN thủ công. Điều này cũng giúp giảm được hóa chất và tối ưu hệ thống cũng như cho phép tự động hóa quá trình phân tích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin, trong đó kit này bao gồm 10 thành phần sau:

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
1	MagSi	Dung dịch đệm Tris-HCl chứa 50 mg/ml hạt nano oxit sắt từ bọc silica kích thước 30-50nm, độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g, pH từ 5 đến 7,5	3 x 1,8ml
2	LB	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7 đến 9	20 ml
		Natri docecyl sulphat (DSD) nồng độ từ 0,2% đến 2%	
		Canxi clorua nồng độ từ 1mM đến 5mM	
3	BB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20nM đến 80nM, pH từ 4 đến 5	40 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2m đến 5M	
		Kali axetat nồng độ từ 0,2M đến 0,8M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
4	BB2	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-80mM, pH 6,5-8,0	40 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 2M đến 5M	
		Natri xitrat nồng độ từ 0,05M đến 0,2M	
		EDTA nồng độ từ 2 đến 10mM	
5	WB1-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ 20-50nM, pH 6,0-7,5	30 ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
6	WB2-1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10nM đến 20nM, pH từ 6,0 đến 7,5	30ml
		Natri clorua nồng độ từ 0,1M đến 0,5M	
7	WB1-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nm đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
		Guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydroclorit nồng độ từ 1M đến 3M	
		Natri clorua nồng độ từ 0,5M đến 1M	
		Etanol nồng độ từ 40% đến 60%	
8	WB2-2	Đệm xitrat nồng độ từ 10nM đến 50nM, pH từ 5 đến 6,5	100ml
9	EB1	Dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25nM đến 35nM, pH	20ml

TT	Ký hiệu	Thành phần	Định lượng
		từ 7,5 đến 9,0	
		EDTA nồng độ từ 1nM đến 2nM	
10	EB2	Nước cất đã được xử lý bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), pH từ 6,0 đến 6,5	20ml.

2. Kit theo điểm 1, trong đó kit này còn có thêm hướng dẫn sử dụng để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin để chẩn đoán bệnh ung thư.

3. Quy trình sản xuất kit theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các công đoạn:

a) Tạo hạt MagSi nano bọc silica:

- tạo hạt nano oxit sắt từ bằng cách hòa tan lần lượt $FeCl_2.4H_2O$ và $FeCl_3.6H_2O$ với nước đạt nồng độ từ 0,4 đến 4% và khuấy đều trong khoảng từ 20 đến 30 phút, sau đó phối trộn hai dung dịch này theo tỷ lệ trọng lượng $FeCl_2.4H_2O/FeCl_3.6H_2O$ từ 1/2 đến 1/3 (w/w) và gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng 50 đến 70°C, sau đó bổ sung dung dịch NH_4OH nồng độ khoảng từ 5 đến 15% đã được gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng từ 50 đến 70°C theo tỷ lệ thể tích từ 1/3 đến 1/4 (w/w), sau khi khuấy trộn đều trong khoảng từ 30 đến 40 phút để phản ứng tạo mầm hạt nano xảy ra thu được dung dịch chứa hạt nano oxit sắt;

- thu hạt nano oxit sắt từ bằng cách sử dụng từ trường mạnh tác dụng lên dung dịch chứa hạt nano Fe_3O_4 trong thời gian từ 5 đến 15 phút để hạt nano tụ xuống, sau đó loại bỏ phần dịch, ngắt từ trường và bổ sung nước cất để rửa, tiếp đó tác dụng từ trường từ 5 đến 15 phút để tụ hạt nano và loại bỏ nước, lặp lại từ 5 đến 10 lần, thu được hạt nano oxit sắt từ sạch; và

- thu hạt MagSi nano bọc silica bằng cách rửa hạt nano oxit sắt từ thu được ở trên bằng cồn, sau đó pha với dung dịch cồn theo tỷ lệ từ 1 đến 2% (g/ml) và bổ sung khoảng từ 5 đến 20% dung dịch bao gồm NH_4OH 25% đã pha với tetraethyl orthosilicat (TEOS) theo tỷ lệ 50/50 (w/w), sau đó bổ sung khoảng 10 đến 30% nước cất và để hỗn dịch này trong bể siêu âm với tần số từ 30 đến 40 kHz trong thời gian từ 1 đến 2 giờ thu được hạt nano sắt từ được bọc lớp silica SiO_2 dày khoảng từ 2 đến 5nm, sau đó lọc rửa bằng nước cất thu được hạt MagSi nano bọc silica kích thước từ 30-50nm có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g;

b) Tạo 10 dung dịch đệm sau:

- tạo dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica (MagSi) bằng cách chuẩn hóa hạt MagSi nano bọc silica thu được ở bước a) và pha với dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH trong khoảng từ 5,0 đến 7 đến nồng độ từ 50 mg/ml, sau khi trộn đều thu được dung dịch đệm chứa hạt MagSi nano bọc silica có độ từ hóa từ 50 emu/g đến 60 emu/g, dung dịch đệm MagSi này được dùng để liên kết đặc hiệu với ADN và ARN;

- tạo dung dịch đệm phân giải (LB) bằng cách bổ sung lần lượt natri dodecyl sulphat (SDS) nồng độ từ 0,2 đến 2%, canxi clorua nồng độ từ 1 mM đến 5 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20mM đến 80mM, pH từ 7,0 đến 9,0 trộn đều, dung dịch đệm LB này được dùng để phá vỡ khối mô, giải phóng ARN/ADN;

- tạo dung dịch đệm liên kết 1 (BB1) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, kali axetat nồng độ từ 0,2 M đến 0,8 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 4,0 đến 5,0 trộn đều, dung dịch đệm BB1 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc ADN lên cột;

- tạo dung dịch đệm liên kết 2 (BB2) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 2 M đến 5 M, natri xitrat nồng độ từ 0,05 M đến 0,2 M, EDTA nồng độ từ 2 mM đến 10 mM vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 80 mM, pH từ 6,5 đến 8,0 và trộn đều, dung dịch đệm BB2 này được dùng để liên kết một cách chọn lọc cả ADN và ARN lên cột;

- tạo dung dịch đệm rửa 1-1 (WB1-1) bằng cách bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M vào dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 20 mM đến 50 mM, pH từ 6,0 đến 7,5 và trộn đều, sau đó bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%, dung dịch đệm WB1-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 1;

- tạo dung dịch đệm rửa 2-1 (WB2-1) bằng cách hòa tan natri clorua nồng độ từ 0,1 M đến 0,5 M với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 10 mM đến 20 mM, pH từ 6,0 đến 7,5, dung dịch đệm WB2-1 này được dùng để rửa phức hệ ADN-MagSi lần 2;

- tạo dung dịch đệm rửa 1-2 (WB1-2) bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5, sau đó

bổ sung guanidin thiocyanat hoặc guanidin hydrochlorit nồng độ từ 1 M đến 3 M, natri clorua nồng độ từ 0,5 M đến 1 M, sau đó bổ sung etanol đến khi nồng độ đạt từ 40% đến 60%, dung dịch đệm WB1-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 1;

- tạo dung dịch đệm rửa 2-2 (WB2-2) bằng cách hòa tan muối natri xitrat với axit xitric tạo dung dịch đệm xitrat có nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, pH từ 5,0 đến 6,5, dung dịch đệm WB2-2 này được dùng để rửa phức hệ ARN-MagSi lần 2;

- tạo dung dịch đệm đẩy 1 (EB1) bằng cách hòa tan EDTA nồng độ từ 1 mM đến 2 mM với dung dịch đệm Tris-HCl nồng độ từ 25 mM đến 35 mM, pH từ 7,0 đến 9,0, dung dịch đệm EB1 này được dùng để đẩy ADN ra khỏi hạt MagSi; và

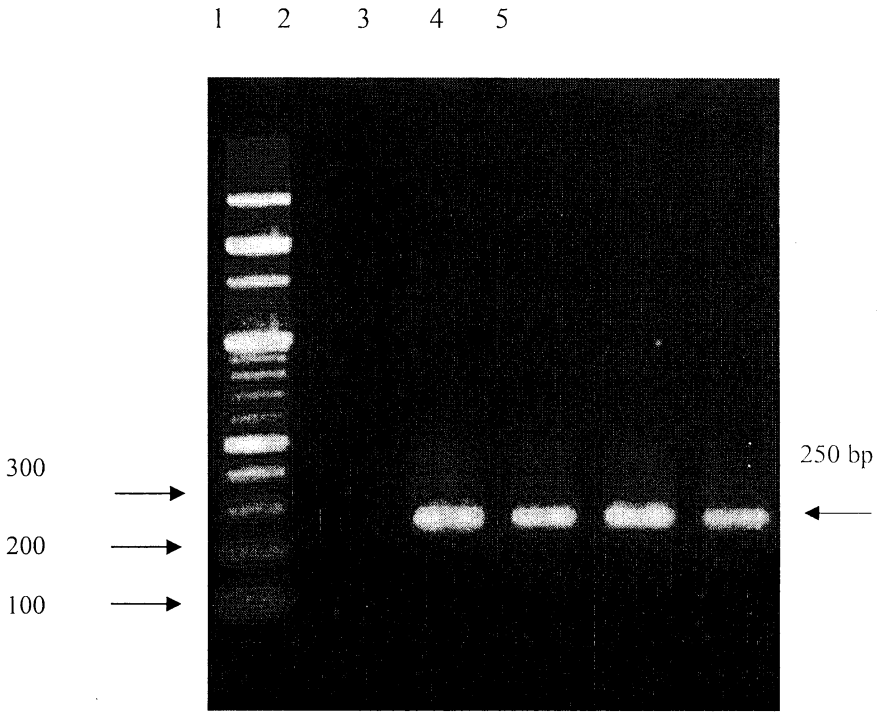
- tạo dung dịch đệm đẩy 2 (EB2) bằng cách xử lý nước cất bằng diethylpyrocarbonat (DEPC), chỉnh pH từ 6,0 đến 6,5, dung dịch đệm EB2 này được dùng để đẩy ARN ra khỏi hạt MagSi; và

c) Tạo kit bằng cách đóng lọ 10 dung dịch thu được ở bước b) với các thành phần và định lượng như sau:

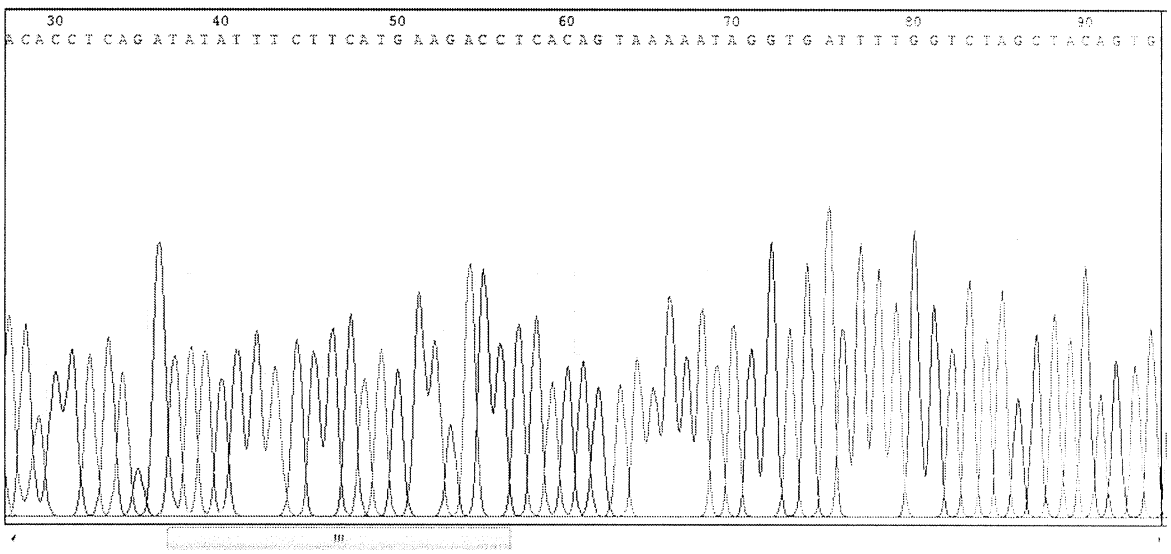
stt	Thành phần	Ký hiệu	Định lượng (ml/lọ)	Số lượng (lọ)
1	Dung dịch đệm chứa hạt MagSi	MagSi	1,8	3
2	Dung dịch đệm phân giải	LB	20	1
3	Dung dịch đệm liên kết 1	BB1	40	1
4	Dung dịch đệm liên kết 2	BB2	40	1
5	Dung dịch đệm rửa 1-1	WB1-1	30	1
6	Dung dịch đệm rửa 2-1	WB2-1	30	1
7	Dung dịch đệm rửa 1-2	WB1-2	100	1
8	Dung dịch đệm rửa 2-2	WB2-2	100	1
9	Dung dịch đệm đẩy 1	EB1	20	1
10	Dung dịch đệm đẩy 2	EB2	20	1.

4. Quy trình sản xuất kit theo điểm 3, trong đó công đoạn c) còn có thêm bước đóng gói cùng hướng dẫn sử dụng kit để chiết ADN và/hoặc ARN từ tiêu bản mô cố định bằng formalin vùi trong parafin nhằm chẩn đoán bệnh ung thư.

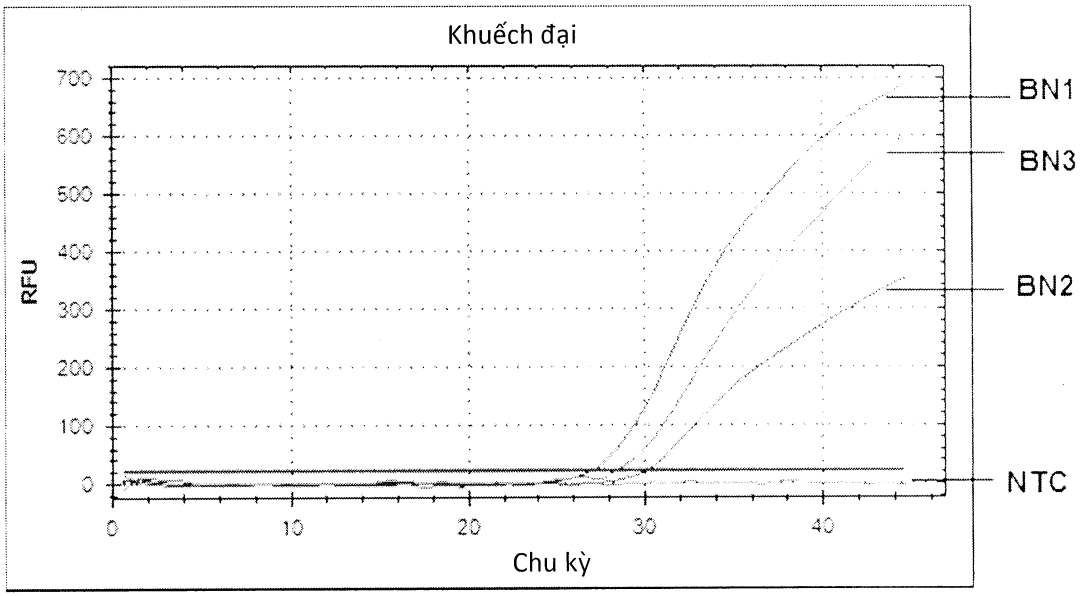
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3


Khuếch đại
RFU
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Chu kỳ
BN1
BN3
BN2
NTC