



(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)



**2-0003681**

(51) **C12Q 1/68; C12N 15/10**  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2020-00132

(22) 03/04/2020

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/10/2021 403

(76) Lê Minh Đức (VN)

6/113 C Lê Đức Thọ, phường 15, quận Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh

(74) Công ty Cổ phần PHANLAW VIETNAM (PHANLAW VIETNAM JSC)

---

(54) **BỘ KIT TÁCH CHIẾT ADN TỪ TẾ BÀO CHUỐI, HÀNH TÂY VÀ NIÊM MẠC  
MIỆNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến bộ kit tách chiết ADN gồm có: 100ml dung dịch muối NaCl 0,9%; 20ml dung dịch phá màng tế bào và màng nhân; 10g enzym bromelain 2.000 IU/g; 20ml dung dịch diphenylamin 0,5% pha trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc; 100ml etanol 70%; 05 túi zip nilon; 05 tấm vải lọc; và 5 tấm giấy lọc. Trong đó, dung dịch phá màng tế bào và màng nhân có thành phần chính là natri dodexyl sulfat.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học phân tử. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến bộ kit tách chiết ADN từ tế bào chuỗi, hành tây và niêm mạc miệng thích hợp sử dụng trong các thí nghiệm tách chiết ADN ở các trường phổ thông hoặc các cơ sở nghiên cứu khác.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Tách chiết ADN là kỹ thuật cơ bản trong hầu hết các phòng thí nghiệm phân tử, di truyền và sinh học nói chung, thậm chí kỹ thuật này còn được phổ cập trong môn sinh học ở trường phổ thông, cụ thể là các thí nghiệm tách chiết ADN từ nguyên liệu là tế bào chuỗi, hành tây và niêm mạc miệng. Mặc dù đối với mỗi loại tế bào, kỹ thuật tách chiết có thể khác nhau, do đó đòi hỏi bộ kit khác nhau, nhưng kỹ thuật tách chiết ADN nói chung bao gồm các bước cơ bản sau: phá màng tế bào; loại bỏ protein và tủa, thu ADN.

Để thực hiện kỹ thuật tách chiết, tốt hơn là cần có các bộ kit có sẵn hoặc tự chuẩn bị thích hợp để thực hiện các bước nêu trên.

Đã biết nhiều bộ kit tách chiết ADN có trên thị trường. Ví dụ:

Bộ kit (SBC Scientific - Phương pháp tách chiết ADN/ARN) gồm: Dung dịch 1 (Trizol) gồm phenol 38%, guanidin thioxyanat (Guanidinium thiocyanate) 0,8M, glyxerol 5%; dung dịch 2 là clorofom (chloroform); dung dịch 3 là isopropanol tuyệt đối chứa chất trợ tủa; dung dịch 4 là etanol 70%; dung dịch 5 là dung dịch TE 1X (Tris 0,1M - EDTA 0,001M); Dụng cụ-thiết bị gồm micropipet (micropipette) và các đầu tip tương ứng, ống li tâm nhựa (ependorf) 1,5ml, máy ly tâm, máy lắc (vortex), máy ủ.

Bộ kit (của Công ty Nghiên cứu Sinh học - NCPPB) gồm: Dung dịch 1 là hỗn hợp chất tẩy natri dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate - SDS), sarcosyl và proteinaza; dung dịch 2 là đệm TE (buffer TE) (pH 8); dung dịch 3 gồm proteinaza K, CTAB và clorofom; dung dịch 4 là etanol 96% hoặc isopropanol; dung dịch 5 là etanol 70%; máy đo quang phổ hoặc máy điện di.

Bộ kit tách chiết ADN của vi khuẩn lao (Bằng độc quyền GPHI số 2-0001780 của Trường Đại học khoa học tự nhiên) gồm có: hạt MagSi nano; các đệm RB, BB, WB1, WB2, và EB.

Bộ kit tách chiết ADN từ tiêu bản mô cố định (Bằng độc quyền GPHI số 2-0002116 của Trường Đại học khoa học tự nhiên) gồm có: hạt MagSi nano; các đệm LB, BB1, BB2, WB1-1, WB2-1, WB1-2, WB2-2, EB1, và EB2.

Các bộ kit tách chiết ADN nêu trên có thành phần hóa chất và dụng cụ - thiết bị tương đối phức tạp, giá thành cao nên không phù hợp với điều kiện dùng trong nhà trường hoặc các cơ sở nghiên cứu không dồi dào về tài chính. Hơn nữa, các bộ kit này không thích hợp để tách chiết ADN từ tế bào chuỗi, hành tây và niêm mạc miệng - là những đối tượng của các thí nghiệm thực hành trong các trường học phổ thông. Do đó, vẫn có nhu cầu tạo ra bộ kit tách chiết ADN từ tế bào chuỗi, hành tây và niêm mạc miệng để sử dụng trong nhà trường.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục những nhược điểm nêu trên.

Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất bộ kit tách chiết ADN chuyên dùng để tách chiết ADN từ tế bào chuỗi sù, hành tây và niêm mạc miệng. Bộ kit này bao gồm các thành phần hóa chất và dụng cụ sẵn có trên thị trường và có giá thành thấp, thao tác đơn giản, thời gian thực hiện

nhanh, đặc biệt bổ sung thêm bước nhận diện ADN bằng diphenylamin, thích hợp để tiến hành trong các thí nghiệm bộ môn sinh học ở các trường Trung học cơ sở (THCS) và Trung học phổ thông (THPT). Cụ thể bao gồm: dung dịch muối NaCl 0,9%; dung dịch phá màng tế bào và màng nhân có thành phần chủ yếu là natri dodexyl sulfat 5%; enzym bromelain (2.000IU/g) để phân giải protein bám trên ADN; dung dịch diphenylamin 0,5% cho phản ứng màu đặc hiệu để nhận diện sản phẩm ADN thu được; etanol 70% giúp kết tủa ADN; túi zip nilon sử dụng cho việc nghiền mẫu; tấm vải lọc dùng lọc mẫu sau khi nghiền; và giấy lọc dùng để lọc enzym bromelain.

Trong đó, muối NaCl sẽ giúp thu được lượng ADN nhiều hơn. Do ADN là phân tử phân cực có gốc phosphat mang điện tích âm, có khả năng liên với các cation ( $\text{Na}^+$ ) của dung dịch muối, trung hòa điện tích của phân tử ADN, làm cho các phân tử ADN có thể kết dính với nhau thay vì đẩy nhau, khi gặp cồn chúng dễ dàng bị kết tủa và được đẩy lên trên dưới tác dụng của các lực vật lý.

Dung dịch phá màng tế bào và màng nhân có chứa thành phần chính natri dodexyl sulfat là chất tẩy hoạt động bề mặt lưỡng tính, vì mang điện tích nên chất tẩy ion hóa có thể phá vỡ liên kết ion và liên kết hydro, có tác dụng biến tính hoàn toàn protein do chất này liên kết với tất cả các nhóm R của protein, phá hủy màng lipid kép của tế bào và nhân bằng cách xen vào giữa hai lớp phospholipit kép, đồng thời cũng phân hủy các protein gắn kết với ADN, tạo điều kiện cho việc kết tủa và cô lập ADN ở các bước kế tiếp.

Trong một phương án ưu tiên, ngoài thành phần chính natri dodexyl sulfat, dung dịch phá màng tế bào và nhân còn bao gồm các thành phần axit alkyl benzen sulfonic mạch thẳng (liner alkyl benzene sulfonic acid - LAS) có tác dụng là chất hoạt động bề mặt và nhũ hóa, NaOH có tác dụng cân bằng độ pH, và cocamidopropyl betaine là chất nhũ hóa, ổn định bọt.

Enzym bromelain có chứa nhóm sulfurhydryl giúp thủy giải các protein histon gắn trên phân tử ADN, tạo thuận lợi cho việc thu hồi ADN tinh sạch.

Etanol 70% dùng để kết tủa phân tử ADN.

Diphenylamin được sử dụng để nhận biết sự có mặt của ADN với phản ứng màu đặc trưng. Thuốc thử diphenylamin 0,5% được pha trong axit sulfuric đậm đặc. Dùng kim mũi mác hoặc que tre nhẹ nhàng vớt một phần kết tủa màu trắng cho vào ống nghiệm có chứa 10ml diphenylamin, đun cách thủy khoảng 10 phút sẽ thấy xuất hiện màu xanh lam chứng minh mẫu kết tủa thu được là ADN.

Dưới đây là hướng dẫn sử dụng bộ kit theo giải pháp hữu ích (cũng là các phương pháp tách chiết ADN từ tế bào chuối, hành tây hoặc niêm mạc miệng nhờ sử dụng bộ kit tách chiết ADN).

Theo đó, để tách chiết ADN từ các tế bào chuối sứ hoặc hành tây bằng bộ kit theo giải pháp hữu ích, cần tiến hành theo 7 bước sau:

*Bước 1:* Cho mẫu vào túi zip, dùng tay hoặc chày nghiền mẫu trong dung dịch muối NaCl 0,9%.

*Bước 2:* Lọc dịch chiết thu được ở bước trên bằng vải lọc.

*Bước 3:* Khuấy tan và ủ enzym bromelain trong 50ml nước ấm 45-55 độ hoặc nước máy ở nhiệt độ phòng trong khoảng 2-5 phút rồi lọc lấy dịch chiết.

*Bước 4:* Cho dung dịch phá màng tế bào vào cốc chứa dịch chiết chuối hoặc hành tây thu được ở bước 2, khuấy nhẹ trong một khoảng thời gian thích hợp trong khoảng 2-5 phút.

*Bước 5:* Phân giải các phân tử protein bám trên ADN bằng cách bổ sung dịch chiết chứa enzym bromelain thu được ở bước 3 vào cốc chứa dung dịch thu được ở bước 4.

*Bước 6:* Tách chiết các phân tử ADN bằng cách rót từ từ etanol 70% lên thành cốc mà có chứa dịch chiết ở bước 5 rồi để yên cho tới khi thấy những sợi màu trắng đục kết tủa dạng các búi lớn và nổi lên trên, dùng kim mũi mác hoặc que tre vớt các búi kết tủa màu trắng này để thu được các phân tử ADN.

*Bước 7:* Kiểm tra sản phẩm thu được bằng cách cho phần kết tủa trắng này vào ống nghiệm có chứa nước, nhỏ thêm dung dịch diphenylamin 0,5% pha trong  $H_2SO_4$  đậm đặc vào ống nghiệm, đun sôi cách thủy, nếu xuất hiện màu xanh lam thì sản phẩm tách chiết được chính là ADN của chuỗi sừ hoặc hành tây.

Để tách chiết ADN từ tế bào niêm mạc miệng bằng bộ kit theo giải pháp hữu ích, các bước tiến hành có sự khác biệt so với tế bào chuỗi và hành tây. Cụ thể cách tách chiết chỉ bao gồm 5 bước sau:

*Bước 1:* Chuẩn bị nguyên liệu bằng cách: xúc miệng thật sạch, sau đó ngâm nước muối NaCl 0,9% để xúc thật mạnh, nhỏ nước vừa xúc miệng vào cốc; lặp lại lần thứ hai, thu được dung dịch có chứa các tế bào niêm mạc miệng.

*Bước 2:* Cho dung dịch phá màng tế bào vào phần dung dịch thu được ở bước 1, khuấy nhẹ.

*Bước 3:* Phân giải các phân tử protein bám trên ADN bằng cách cho dung dịch enzym bromelain vào dung dịch thu được ở bước 2.

*Bước 4:* Tách chiết các phân tử ADN bằng cách rót từ từ etanol 70% lên thành cốc mà có chứa dịch chiết ở bước 3 rồi để yên cho đến khi thấy những sợi màu trắng đục kết tủa dạng các búi lớn và nổi lên trên, dùng kim mũi mác hoặc que tre vớt các búi kết tủa màu trắng này để thu được các phân tử ADN.

*Bước 5:* Kiểm tra sản phẩm thu được bằng cách cho phần kết tủa trắng này vào ống nghiệm có chứa nước, nhỏ dung dịch diphenylamine

0,5% pha trong  $H_2SO_4$  đậm đặc vào ống nghiệm, đun sôi cách thủy, nếu xuất hiện màu xanh lam thì sản phẩm phân tách chiết được chính là ADN của tế bào niêm mạc miệng.

Bộ kit tách chiết ADN theo giải pháp hữu ích giúp cho việc tách chiết ADN từ các tế bào chuỗi sù, hành tây và niêm mạc miệng rất hiệu quả nhưng lại dễ sử dụng với chi phí thấp. Vì lý do đó, bộ kit đặc biệt thích hợp để sử dụng cho các thí nghiệm môn Sinh vật ở các trường THCS và THPT.

### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây là phần mô tả chi tiết giải pháp hữu ích. Giải pháp hữu ích đề cập đến bộ kit tách chiết ADN chuyên dùng để tách chiết ADN từ các tế bào chuỗi sù, hành tây hoặc tế bào niêm mạc miệng, gồm có:

- 100ml dung dịch muối NaCl 0,9%;
- 20ml dung dịch phá màng tế bào và màng nhân;
- 10g enzym bromelain 2.000 IU/g;
- 20ml dung dịch diphenylamin 0,5% pha trong  $H_2SO_4$  đậm đặc (98-99,9%);
- 100ml etanol 70%;
- 05 túi zip nilon;
- 05 tấm vải lọc;
- 05 tấm giấy lọc.

Theo một phương án ưu tiên, dung dịch phá màng tế bào và màng nhân là hỗn hợp có thành phần chính là natri dodexyl sulfat 5%.

Theo một phương án cụ thể, 20ml dung dịch phá màng tế bào và màng nhân của bộ kit là hỗn hợp gồm có:

- 6ml natri dodexyl sulfat 5%;
- 4,8ml axit alkyl benzen sulfonic mạch thẳng đậm đặc ( $\geq 96\%$ );
- 0,72g NaOH khan ( $\geq 98\%$ );
- 0,72ml cocamidopropyl betaine đậm đặc ( $\geq 30\%$ ); và

7,76ml nước.

Bộ kit để tách chiết ADN nêu trên được tạo ra với mục đích để tách chiết ADN từ các tế bào chuối sứ, hành tây hoặc niêm mạc miệng và đặc biệt hữu hiệu để sử dụng trong dạy thực hành thí nghiệm bộ môn Sinh học ở bậc THCS và THPT.

Dưới đây là hướng dẫn sử dụng bộ kit theo giải pháp hữu ích (cũng là các phương pháp tách chiết ADN từ tế bào chuối, hành tây hoặc niêm mạc miệng nhờ sử dụng bộ kit tách chiết ADN), được thể hiện dưới dạng ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích.

Theo đó, để tách chiết ADN từ các tế bào chuối sứ hoặc hành tây bằng bộ kit theo giải pháp hữu ích, cần tiến hành theo 7 bước sau, trong đó các hóa chất dưới đây được lấy theo tỷ lệ so với nguyên liệu:

*Bước 1:* Chuẩn bị nguyên liệu bằng cách cho 50g chuối sứ, hoặc 50g hành tây, vào túi zip, nghiền nhỏ bằng tay hoặc chày cùng với 20ml dung dịch muối NaCl 0,9%.

*Bước 2:* Lọc lấy 30ml dịch chiết từ chuối, hoặc hành tây, vừa nghiền ở bước trên bằng vải lọc.

*Bước 3:* Ủ 5g enzym bromelain 2.000 IU/g trong 50ml nước ấm ở nhiệt độ khoảng 45-55°C trong khoảng 2-5 phút (nếu không có nước ấm có thể lấy nước máy ở nhiệt độ phòng), sau đó lọc lấy dịch chiết.

*Bước 4:* Cho 10ml dung dịch phá màng tế bào vào cốc chứa 30ml dịch chiết chuối hoặc hành tây thu được ở bước 2, khuấy nhẹ trong khoảng 2-5 phút.

*Bước 5:* Phân giải các phân tử protein bám trên ADN bằng cách bổ sung 5-10ml dịch chiết chứa enzym bromelain (ở bước 3) vào cốc chứa dung dịch thu được ở bước 4.

*Bước 6:* Tách chiết các phân tử ADN bằng cách rót từ từ 100ml etanol 70% lên thành cốc mà có chứa dịch chiết ở bước 5 rồi để yên cho tới khi thấy những sợi màu trắng đục kết tủa dạng các búi lớn và nổi lên trên, dùng



kim mũi mác hoặc que tre vớt các búi kết tủa màu trắng này để thu được các phân tử ADN.

*Bước 7:* Kiểm tra sản phẩm thu được bằng cách cho phân kết tủa trắng này vào ống nghiệm có chứa sẵn 5ml nước, nhỏ thêm 5ml dung dịch diphenylamine 0,5% pha trong  $H_2SO_4$  đậm đặc vào ống nghiệm, đun sôi cách thủy trong khoảng 10 phút, nếu xuất hiện màu xanh lam thì sản phẩm tách chiết được chính là ADN của chuỗi sừ hoặc hành tây.

Để tách chiết ADN từ tế bào niêm mạc miệng bằng bộ kit theo giải pháp hữu ích, các bước tiến hành có sự khác biệt so với tế bào chuỗi và hành tây. Cụ thể cách tách chiết bao gồm 5 bước sau, trong đó các hóa chất dưới đây được lấy theo tỷ lệ so với nguyên liệu:

*Bước 1:* Chuẩn bị nguyên liệu bằng cách: xúc miệng thật sạch, sau đó ngậm khoảng 20-30ml nước muối 0,9% để xúc thật mạnh, nhỏ nước vừa xúc miệng vào cốc thủy tinh 250ml; lặp lại lần thứ hai, ta thu được khoảng 40-60ml dung dịch có chứa các tế bào niêm mạc miệng.

*Bước 2:* Cho 5ml dung dịch phá màng tế bào vào phần dung dịch thu được ở bước 1, khuấy nhẹ trong khoảng 2-5 phút.

*Bước 3:* Phân giải các phân tử protein bám trên ADN bằng cách cho 5-10ml dung dịch enzym bromelain vào dung dịch thu được ở bước 2.

*Bước 4:* Tách chiết các phân tử ADN bằng cách rót từ từ 100ml etanol 70% lên thành cốc mà có chứa dịch chiết ở bước 3 rồi để yên cho đến khi thấy những sợi màu trắng đục kết tủa dạng các búi lớn và nổi lên trên, dùng kim mũi mác hoặc que tre vớt các búi kết tủa màu trắng này để thu được các phân tử ADN.

*Bước 5:* Kiểm tra sản phẩm thu được bằng cách cho phân kết tủa trắng này vào ống nghiệm có chứa sẵn 2ml nước, nhỏ thêm 2ml dung dịch diphenylamin 0,5% pha trong  $H_2SO_4$  đậm đặc vào ống nghiệm, đun sôi cách

thủy trong khoảng 10 phút, nếu xuất hiện màu xanh lam thì sản phẩm phân tách chiết được chính là ADN của tế bào niêm mạc miệng.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Bộ kit tách chiết ADN theo giải pháp hữu ích giúp cho việc tách chiết ADN từ các tế bào chuỗi sù, hành tây và niêm mạc miệng rất hiệu quả nhưng lại dễ sử dụng với chi phí thấp, tách ADN với thời gian rất ngắn (2-5 phút), sử dụng các dụng cụ đơn giản. Đặc biệt có bổ sung phần nhận biết phân tử ADN thu được bằng dung dịch diphenylamin. Bộ KIT này có thể sử dụng để tách chiết ADN với nhiều mẫu vật khác như xoài, dâu tây, đu đủ, gan gà, gan heo, v.v.. Vì lý do đó, bộ kit đặc biệt thích hợp để sử dụng cho các thí nghiệm môn Sinh vật ở các trường THCS và THPT.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Bộ kit tách chiết ADN từ tế bào chuỗi, hành tây và niêm mạc miệng, bộ kit này gồm có:

100ml dung dịch muối NaCl 0,9%;

20ml dung dịch phá màng tế bào và màng nhân;

10g enzym bromelain 2.000 IU/g;

20ml dung dịch diphenylamin 0,5% pha trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc;

100ml etanol 70%;

05 túi zip nilon;

05 tấm vải lọc;

05 tấm giấy lọc;

trong đó 20ml dung dịch phá màng tế bào và màng nhân là hỗn hợp gồm có:

6ml natri dodexyl sulfat 5%;

4,8ml axit alkyl benzen sulfonic mạch thẳng đậm đặc;

0,72g NaOH khan;

0,72ml cocamidopropyl betaine đậm đặc; và

7,76ml nước.