



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

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

(11)



2-0002841

(51) **C12Q 1/68; G01N 33/53**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00426

(22) 27/09/2019

(67) 1-2019-05294

(45) 25/03/2022 408

(43) 25/11/2019 380A

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ (VN)**

Nhà E3, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) **Bùi Thanh Tùng (VN); Đỗ Quang Lộc (VN); Chử Đức Trình (VN).**

(54) **THIẾT BỊ VI LÔNG ĐỂ PHÁT HIỆN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI A549 VÀ QUY TRÌNH PHÁT HIỆN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến thiết bị vi lông phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 và quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549. Thiết bị theo giải pháp hữu ích có các điện cực trên chip được bố trí ở dạng các đường tròn đồng tâm cho phép làm giàu và cố định dòng tế bào ung thư phổi A549 thông qua điện trường và các aptame đặc hiệu. Thiết bị và quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép phát hiện ung thư sớm đối với dòng tế bào ung thư phổi A549.

Lĩnh vực kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực y sinh và thiết bị phân tích, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến đề cập đến thiết bị vi lỏng để phát hiện tế bào ung thư phổi A549 và quy trình phát hiện sớm tế bào ung thư phổi A549 bằng thiết bị này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ngày nay bệnh ung thư là nguyên nhân gây tử vong thứ hai chỉ sau bệnh tim mạch. Trong quá trình sinh bệnh, các tế bào ung thư tách ra khỏi khối u ban đầu và đi vào máu, trở thành các tế bào ung thư tuần hoàn (CTCs) và có thể được coi như giai đoạn đầu của quá trình di căn. Do đó, việc phát hiện bệnh ung thư nói chung và ung thư phổi nói riêng càng sớm càng tốt để các bác sĩ sẽ có phương pháp điều trị thích hợp và hiệu quả. Trong kỹ thuật tầm soát bệnh hiện nay, các bác sĩ thường lấy máu của bệnh nhân rồi dùng các kháng thể đặc hiệu để tìm kiếm sự hiện diện của CTC. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ cho kết quả nếu CTC xuất hiện với lượng lớn còn với lượng nhỏ CTC thì khó phát hiện chính xác.

Đã có nhiều phương pháp nhằm chẩn đoán sớm bệnh ung thư dựa trên việc phát hiện sớm tế bào mang thụ thể đặc hiệu. Tuy nhiên, một vấn đề cần khắc phục đó là để chẩn đoán sớm lượng tế bào ung thư, cần có khả năng làm giàu lượng tế bào này và khả năng bắt cặp đặc hiệu tế bào này với chất đánh dấu. Hiện có hai kỹ thuật chính được áp dụng đó là tăng mật độ chất đánh dấu trên một diện tích bề mặt các cảm biến hoặc là chọn lọc đặc hiệu tế bào dựa trên đặc tính thụ thể bề mặt. Tuy nhiên, cả hai phương pháp này đều cho kết quả không cao do tỷ lệ tế bào mang thụ thể đặc trưng bệnh đôi khi rất thấp và điều này ảnh hưởng đến sai số và là giới hạn trong việc phát hiện, chẩn đoán sớm bệnh ung thư.

Vì vậy, việc phát triển các thiết bị có kích thước nhỏ có thể được áp dụng trong các ứng dụng xét nghiệm tại chỗ, có khả năng phát hiện các tế bào ung thư CTC nhanh, thuận tiện và chính xác là một yêu cầu cấp thiết trong quá trình điều trị bệnh ung thư trên thế giới. Các thiết bị này cần phải có đầy đủ các chức năng từ sàng lọc tế

bào, làm giàu tế bào, bẫy và bắt các tế bào đích, đo nồng độ tế bào, chuyển sang thông tin điện tử để xử lý trong các bộ vi điều khiển.

Tài liệu D1 (US 8303911 B2, 06/11/2012) đề cập đến hệ thống vi dòng và phương pháp để xử lý mẫu, trong đó hệ thống này cho phép cấp mẫu vào các ô trên đĩa CD theo các vi kênh nhằm mục đích cố định mẫu sinh học lên bề mặt các khoang nhằm mục đích phân tích mẫu. Thiết bị này cho phép mẫu được cấp theo các kênh phức tạp để gắn mẫu lên đĩa với nồng độ cao thông qua lực ly tâm.

Tài liệu D2 (US 2011/189701, 04/08/2011) đề cập đến thiết bị vi dòng và phương pháp phân tích mẫu lỏng, trong đó thiết bị này có đa kênh cấp mẫu được gắn với nhau cho phép cấp mẫu độc lập để sử dụng tăng mức độ phân tích mẫu.

Tài liệu D3 (US 6527423, 04/03/2003) đề cập đến thiết bị vi lỏng, trong đó thiết bị này bao gồm một tấm nền, trên đó có các vi kênh được bố trí theo chiều zíc zắc hướng tâm, theo đó khi thiết bị vận hành, mẫu từ khoang tâm cấp mẫu theo lực ly tâm chảy theo các vi kênh đổ vào khoang cố định mẫu. Lượng mẫu được nén đầy trong khoang mẫu, không khí có trong khoang này và lượng mẫu dư được thoát ra ngoài theo một kênh được bố trí gần với các vi kênh theo đỉnh tính từ tâm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề cập đến thiết bị vi lỏng để phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 và quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549. Thiết bị và quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép ứng dụng trong chẩn đoán để phát hiện sớm bệnh ung thư phổi.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến thiết bị vi lỏng để phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549, trong đó thiết bị này bao gồm phần đế được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh có khoang làm giàu và vi điện cực được bố trí khớp với khoang làm giàu này, giữa vi điện cực và khoang làm giàu được cách nhau bởi lớp cách ly, điện cực được kết nối với bên ngoài bởi hệ dây dẫn kết nối với thiết bị ngoại vi, trong đó:

Phần đế được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng;

Khối chứa cấu trúc vi kênh được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS), trên đó có cấu trúc vi kênh được khắc trên một mặt của khối bao gồm các kênh dẫn nối với buồng trộn vi lỏng đến khoang làm giàu hình tròn đến kênh thoát, phía đầu các kênh

dẫn có bố trí các cửa nạp và kênh thoát có bố trí cửa thoát, các cửa nạp và cửa thoát này được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh đến mặt còn lại của khối, các cửa nạp và cửa thoát được gắn với các đầu kết nối chữ L và gắn với các đường dẫn mẫu, thiết bị này có từ 1 đến 10 cửa nạp được bố trí độc lập và có các kênh dẫn tương ứng dẫn vào buồng trộn vi lỏng, buồng trộn vi lỏng có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn để trộn đều vật liệu cấp từ các kênh dẫn này;

Lớp cách ly được bố trí giữa vi điện cực và khoang làm giàu được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS) có độ dày khoảng 1 μm ;

Vi điện cực được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình tròn với đường kính bằng đường kính khoang làm giàu, trên vi điện cực này bao gồm điện cực trung tâm có dạng hình tròn nằm ở tâm của cấu trúc vi điện cực, tiếp đó là các điện cực cảm biến và điện cực tham chiếu là các dải nửa hình tròn bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm và các điện cực thao tác là các dải hình tròn hở đồng tâm bao quanh điện cực cảm biến và điện cực tham chiếu, đầu của các điện cực này được gắn lần lượt với hệ dây dẫn kết nối để độc lập kết nối với thiết bị ngoại vi, trên điện cảm biến được chức hóa để bắt cặp với các aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; và

Hệ dây dẫn được bố trí sát phần đế thủy tinh, trong đó hệ dây dẫn này kết nối các đầu điện cực trung tâm, điện cực cảm biến, điện cực tham chiếu, điện cực thao tác để độc lập kết nối các điện cực này với thiết bị ngoại vi;

khi được lắp ghép, hệ dây dẫn nối với các điện cực trên vi điện cực được đặt sát với phần đế, tiếp đó phần đế này được ghép với cấu trúc vi kênh sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh được ép kín với phần đế và điện cực nằm chính giữa khoang làm giàu và được ngăn cách với không gian của khoang làm giàu bởi lớp cách ly, tạo cấu trúc vi kênh kín, phía đầu các kênh dẫn và kênh thoát được gắn với các đầu kết nối chữ L thông qua các cửa nạp và cửa thoát, đầu còn lại của đầu kết nối chữ L được nối với các đường dẫn mẫu tạo thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh;

theo đó, khi thực hiện phát hiện tế bào ung thư phổi A549, mẫu aptame được bơm vào đường dẫn mẫu qua cửa nạp đi qua buồng trộn vi lỏng đến khoang làm giàu để cố định các aptame trên điện cực cảm biến, sau khi rửa phần dư, mẫu phát hiện được bơm tiếp qua cửa nạp đến đầy khoang làm giàu, đồng thời áp điện thế vào các điện cực thao tác

lần lượt theo hướng từ ngoài vào tâm để làm giàu tế bào ung thư phổi A549 và đo trở kháng và trở kháng vi sai để xác định tế bào ung thư phổi A549.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó khoang làm giàu có chiều cao khoảng 50 μm bán kính khoang làm giàu này khoảng 500 μm và vi điện cực trong khoang làm giàu có chiều dày khoảng 1 μm .

Theo một phương án ưu tiên, trong đó số lượng điện cực thao tác có từ 1 đến 50 điện cực có độ rộng mỗi điện cực khoảng 50 micromet được bố trí trên các cung tròn cách đều nhau hướng tâm bao quanh điện cực trung tâm ở tâm vi điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó điện cực cảm biến được chức hóa bằng cầu nối SH-PEG-COOH trên cơ sở chất xúc tác EDC/NHS với các nồng độ khác nhau để gắn kết đặc hiệu với aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 đặc hiệu với dòng tế bào ung thư phổi A549.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 bằng thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích, trong đó các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi;

b) cố định aptame vào khoang làm giàu bằng cách bơm đồng thời dung dịch chứa aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 theo ống dẫn dung dịch thứ nhất qua kênh dẫn thứ nhất và bơm dung dịch đệm theo ống dẫn dung dịch thứ hai qua kênh dẫn thứ hai để phối trộn với nồng độ định trước trong buồng trộn vi lỏng và làm đầy khoang làm giàu, tiến hành ủ trong khoảng 60 phút để aptame cố định trên bề mặt điện cực cảm biến;

c) rửa khoang làm giàu bằng cách bơm dung dịch PBS theo ống dẫn dung dịch thứ hai liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ 10 μL /giây để rửa các thành phần không cố định trên bề mặt điện cực cảm biến;

d) cấp mẫu cần phát hiện tế bào A549 bằng cách huyền phù hóa mẫu trong dung dịch đệm và cấp vào khoang làm giàu thông qua cửa nạp với tốc độ 10 μL /giây đến khi lấp đầy khoang làm giàu;

e) làm giàu tế bào A549 bằng cách áp lực điện di điện môi (DEP) trên các tế bào bằng cách áp điện thế lên các cặp điện cực thao tác cạnh nhau theo hướng từ ngoài vào trong phía tâm để tập trung tế bào A549 vào các điện cực đã được cố định aptame bắt

cặp đặc hiệu với tế bào A549, sau đó ủ khoang làm giàu trong khoảng 60 phút để cố định tế bào A549 trên bề mặt điện cực;

f) loại bỏ tế bào không đặc hiệu bằng cách bơm dung dịch PBS vào khoang làm giàu thông qua các cửa nạp liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ 10 μL /giây để rửa các tế bào không bám đặc hiệu với aptame được cố định trên điện cực; và

g) xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực bằng cách đo trở kháng và đo trở kháng vi sai điện cực trung tâm, điện cực cảm biến và điện cực tham chiếu từ đó xác định được dòng tế bào A549 có trên bề mặt điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo trở kháng giữa điện cực cảm biến và điện cực trung tâm bởi thiết bị phân tích trở kháng (Impedance Analyzer) để so sánh giá trị chênh lệch trở kháng giữa hai điện cực từ đó định lượng được lượng tế bào có mặt ở điện cực cảm biến hoặc điện cực trung tâm.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo thực hiện đo độ chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với điện cực cảm biến và điện cực trung tâm với điện cực tham chiếu thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực dưới 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 với đầu 5' được thế nhóm thiol (-SH) hoặc nhóm amin (-NH₂).

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch đệm được sử dụng trong bước cố định aptame được chọn từ nhóm các dung dịch bao gồm: HEPES(pH 7,5): 40mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂; PBS (pH 7,4): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1

mM Na_2HPO_4 , 1,76mM KH_2PO_4 ; Tris-HCl (pH 7,5): 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 1mM EDTA; TE (pH 8,0): 10mM Tris, 1mM EDTA).

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thời gian áp điện thế lên các điện cực thao tác cạnh nhau trong bước làm giàu tế bào A549 có thời gian khoảng 60 giây cho mỗi bước áp điện thế.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó trước bước cố định aptame còn bao gồm bước chức hóa bề mặt điện cực cảm biến với cầu SH-PEG-COOH bằng cách đưa dung dịch SH-PEG-COOH vào thiết bị vi lỏng đồng thời thông qua các cửa nạp và kênh dẫn đến khoang làm giàu và ủ trong thời gian khoảng 60 phút.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ mô tả cấu trúc của thiết bị vi lỏng để phát hiện tế bào ung thư phổi A549 theo giải pháp hữu ích, (A) mô tả sơ đồ lắp ghép các thành phần của thiết bị vi lỏng, (B) mô tả sơ đồ của cấu trúc vi kênh trong khối chứa cấu trúc vi kênh.

Hình 2 là hình vẽ mô tả sơ đồ của vi điện cực, trong đó có bố trí điện cực trung tâm (117) ở chính giữa tâm đường tròn, điện cực cảm biến (115) và điện cực tham chiếu (116) được bố trí đối xứng nhau quanh điện cực trung tâm và các điện cực thao tác (114) có dạng cung tròn đồng tâm bao quanh điện cực trung tâm.

Hình 3 là hình vẽ mô tả quy trình sản xuất thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích với các quy trình bốc bay, ăn mòn, tạo lớp cách ly bề mặt để thu được cấu trúc vi kênh của thiết bị theo giải pháp hữu ích.

Hình 4 là hình vẽ mô tả sơ đồ mô tả quy trình chuẩn bị điện cực bằng cách chức hóa bề mặt điện cực bẫy với cầu SH-PEG-COOH và aptame đặc hiệu với dòng tế bào đích A549.

Hình 5 là hình ảnh chụp dưới kính hiển vi thể hiện kết quả ủ tế bào A549 trên bề mặt điện cực vàng đã được chức hóa sử dụng cầu SH-PEG-COOH và aptame đặc hiệu với dòng tế bào đích A549 với đối chứng bề mặt thủy tinh tại hai nồng độ aptame khi thực hiện ủ: (a) 25 μM NH_2 -Aptame; (b) 10 μM NH_2 -Aptame.

Hình 6 là hình ảnh kính hiển vi thể hiện kết quả thao tác tế bào A549 trong buồng vi lỏng.

Hình 7 là hình ảnh thể hiện kết quả phát hiện tế bào A549 trên vùng cảm biến của cấu trúc điện cực trong buồng vi lỏng sau khi thực hiện làm giàu tế bào ứng với số lượng tế bào khác nhau.

Hình 8 là ảnh chụp thể hiện kết quả làm giàu tế bào bằng vi điện cực theo giải pháp hữu ích.

Hình 9 là ảnh chụp phát hiện tế bào dựa trên phương pháp phân tích trở kháng tại các tần số kích thích khác nhau ứng với số lượng tế bào khác nhau trong buồng vi lỏng.

Hình 10 là kết quả phát hiện tế bào dựa trên phương pháp trở kháng vi sai tại các số lượng tế bào khác nhau trong buồng vi lỏng

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 có viện dẫn đến hình vẽ, tuy nhiên, các phương án này chỉ là các ví dụ thực hiện cụ thể nhằm mục đích bộc lộ các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Hình 1 mô tả cấu trúc của thiết bị vi lỏng để phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 theo một phương án cụ thể của giải pháp hữu ích. Theo Hình 1A, thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích bao gồm phần đế 110 được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh 111 có khoang làm giàu 104 và vi điện cực 108 được bố trí khớp với khoang làm giàu 104 này. Giữa vi điện cực 108 và khoang làm giàu 104 được cách nhau bởi lớp cách ly 107. Vi điện cực 108 bao gồm nhiều điện cực tích hợp và được kết nối với bên ngoài bởi hệ dây dẫn 109 kết nối với thiết bị ngoại vi.

Phần đế 110 được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng. Phần đế này nhằm mục đích để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng.

Khối chứa cấu trúc vi kênh 111 được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS). Trên khối chứa cấu trúc vi kênh này có vi kênh được khắc trên một mặt của khối. Cấu trúc vi kênh (Hình 1B) được khắc trên khối chứa cấu trúc vi kênh và bao gồm các kênh dẫn 102 nối với buồng trộn vi lỏng 103 đến khoang làm giàu 104 hình tròn đến kênh thoát 105. Phía đầu các kênh dẫn 102 có bố trí các cửa nạp 101 và kênh thoát 105 có bố trí cửa thoát 106. Các cửa nạp 101 và cửa thoát 106 này được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh 111 đến mặt còn lại của khối. Các bố trí này cho phép dễ dàng thao tác và lắp ghép các đầu kết nối chữ L 113 dễ dàng cho việc thao tác, lắp đặt. Các cửa nạp 101 và cửa thoát 106 được gắn với các đầu kết nối chữ L 113 và gắn với các đường dẫn mẫu 112. Theo đó, khi mẫu hoặc dung dịch rửa hoặc dung dịch đệm được dẫn từ đường dẫn mẫu 112 đi qua đầu kết nối chữ L 113 vào buồng trộn vi

lòng 103 để trộn theo nồng độ định trước sẽ đi vào khoang làm giàu và sau đó có thể được rửa qua cửa thoát 106 ra ngoài.

Theo một phương án ưu tiên cụ thể, trong đó thiết bị này có từ 1 đến 10 cửa nạp 101 được bố trí độc lập và có các kênh dẫn 102 tương ứng dẫn vào buồng trộn vì lòng 103. Theo các phương án ưu tiên khác, số lượng cửa nạp 101 và kênh dẫn 102 là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9. Số lượng cửa nạp và kênh dẫn này có thể được bố trí theo nhiều cách khác nhau và tùy vào số lượng mẫu, dung môi, chất đệm được cấp cho thiết bị để có thể tăng hoặc giảm số lượng cửa nạp và kênh dẫn này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, với số lượng cửa nạp và kênh dẫn khác nhau thích hợp mục đích để thuận lợi và tự động hóa quá trình phân tích và hoàn toàn có thể bố trí các cửa nạp và kênh dẫn theo mục đích phân tích mẫu.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó buồng trộn vì lòng 103 có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn 102 để trộn đều vật liệu cấp từ các kênh dẫn 102 này.

Giữa vi điện cực 108 và khoang làm giàu 104 được cách ly bởi lớp cách ly 107 được bố trí ở giữa. Lớp cách ly 107 này được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS) có độ dày khoảng 1 μm .

Theo một phương án ưu tiên, trong đó khoang làm giàu 104 có chiều cao khoảng 50 μm và bán kính khoang làm giàu 104 này khoảng 500 μm .

Hình 2 thể hiện cấu trúc của vi điện cực 108, vi điện cực 108 được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình tròn với đường kính bằng đường kính khoang làm giàu 104. Theo một phương án ưu tiên, vi điện cực 108 trong khoang làm giàu 104 có chiều dày khoảng 1 μm . Theo một phương án ưu tiên, vi điện cực này được chế tạo từ vàng, theo một phương án ưu tiên khác, vi điện cực này được chế tạo từ indium thiếc oxit (ITO). Trên vi điện cực 108 này bao gồm điện cực trung tâm 117 có dạng hình tròn nằm ở tâm của cấu trúc vi điện cực 108. Điện cực trung tâm 117 là điện cực được sử dụng để đo độ chênh lệch trở kháng so với điện cực cảm biến 115 gắn đặc hiệu dòng tế bào A549. Điện cực cảm biến 115 và điện cực tham chiếu 116 là các dải nửa hình tròn bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm 117. Bằng cách bố trí này, khi tế bào được làm giàu và gắn trên điện cực cảm biến 115, việc so sánh trở kháng giữa điện cực trung tâm 117 và điện cực tham chiếu 116 sẽ xác định được lượng tế bào A549 gắn trên điện cực cảm biến so với điện cực cảm biến 115 thông qua việc chênh lệch trở kháng.

Điện cực cảm biến 115 được chức hóa bằng cầu nối SH-PEG-COOH trên cơ sở chất xúc tác EDC/NHS với các nồng độ khác nhau để gắn kết đặc hiệu với aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 đặc hiệu với dòng tế bào ung thư phổi A549.

Các trình tự aptame đặc hiệu với dòng tế bào A549 được các tác giả phát triển trên cơ sở thụ thể đặc hiệu dòng tế bào A549, có tác dụng bắt cặp với tế bào đích thông qua nhóm chức CO-NH của chuỗi PEG gắn với bề mặt điện cực vàng (như mô tả bằng sơ đồ trên Hình 4). Các aptame này có trình tự như sau:

ACGCTCGGATGCCACTACAGGGTTGCATGCCGTGGGGAGGGGGGTGGGTT
TTATAGCGTA CTCAGCTCAT GGACGTGCTG GTGAC (SEQ ID NO.1) và

ACGCTCGGATGCCACTACAGGGTTGCATGCCGTGGGGAGGGGGGTGGGTT
TTATAGCGTACTCAGCTCATGGACGTGCTG GTGA (SEQ ID NO.2)

Các điện cực thao tác 114 được chức hóa là các dải hình tròn hở đồng tâm bao quanh điện cực cảm biến 115 và điện cực tham chiếu 116. Theo một phương án ưu tiên, số lượng điện cực thao tác 114 có từ 1 đến 50 điện cực có độ rộng mỗi điện cực khoảng 50 micromet được bố trí trên các cung tròn cách đều nhau hướng tâm bao quanh điện cực trung tâm 117 ở tâm vi điện cực 108. Điện cực thao tác 114 có chức năng gom tế bào có khoang làm giàu tập trung vào điện cực cảm biến 115 để cố định tế bào trên điện cực này. Bằng cách bố trí nhiều điện cực đồng tâm, khi áp điện thế lên các điện cực thao tác lần lượt từ bên ngoài vào bên trong phía tâm, các tế bào được “đẩy” về phía tâm, do đó làm giàu được lượng tế bào cần phân tích.

Theo một phương án ưu tiên, số lượng điện cực thao tác 114 trên vi điện cực 108 có từ 1 đến 50 điện cực. Chiều rộng mỗi điện cực khoảng 50 micromet và được bố trí trên các cung tròn cách đều nhau hướng tâm bao quanh điện cực trung tâm 117 ở tâm vi điện cực 108 này.

Hệ dây dẫn 109 được bố trí sát phần đế thủy tinh, trong đó hệ dây dẫn này kết nối các đầu điện cực trung tâm 117, điện cực cảm biến 115, điện cực tham chiếu 116, điện cực thao tác 114 để độc lập kết nối các điện cực này với thiết bị ngoại vi.

Để tạo cấu trúc hoàn chỉnh, hệ dây dẫn 109 nối với các điện cực trên vi điện cực 108 được đặt sát với phần đế 110 được ghép với phần đế 110. Tiếp đó phần đế này được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh 111 sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh được ép kín với phần đế 110 và vi điện cực 108 nằm chính giữa khoang làm giàu 104.

Vi điện cực 108 được ngăn cách với không gian của khoang làm giàu 104 bởi lớp cách ly 107 tạo cấu trúc vi kênh kín. Phía đầu các kênh dẫn 102 và kênh thoát 105 được gắn với các đầu kết nối chữ L 113 thông qua các cửa nạp 101 và cửa thoát 106. Đầu còn lại của đầu kết nối chữ L 113 được nối với các đường dẫn mẫu tạo thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh.

Khi vận hành, mẫu chứa aptame được bơm vào đường dẫn mẫu qua cửa nạp 101 đi qua buồng trộn vi lỏng 103 đến khoang làm giàu 104 để cố định các aptame trên điện cực cảm biến 115. Sau khi rửa phần dư, mẫu phát hiện được bơm tiếp qua cửa nạp 101 đến đầy khoang làm giàu 104, đồng thời áp điện thế vào các điện cực thao tác 114 lần lượt theo hướng từ ngoài vào tâm để làm giàu tế bào ung thư phổi A549. Tiếp đó đo trở kháng và trở kháng vi sai trên các điện cực, căn cứ vào trở kháng chênh lệch giữa các cặp điện cực sẽ xác định được lượng tế bào ung thư phổi A549.

Hình 3 mô tả quy trình sản xuất thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích với các quy trình bốc bay, ăn mòn, tạo lớp cách ly bề mặt để thu được cấu trúc vi kênh của thiết bị theo giải pháp hữu ích như mô tả trong Ví dụ 1. Trong đó PDMS được trộn và đổ lên khuôn, sau khi gia nhiệt ở 70°C trong 6 giờ, tiến hành tách và đục lỗ để tạo tấm chứa cấu trúc vi kênh. Phần đế thủy tinh được tiến hành phủ khuôn và bốc bay, ăn mòn để tạo ra hệ dây dẫn và các điện cực. Tiếp đó tiến hành kích hoạt bề mặt đến PDMS và bề mặt đế thủy tinh bằng O₂ plasma và đóng gói sản phẩm thu được thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích có các vi kênh được khắc.

Hình 5 là hình ảnh chụp dưới kính hiển vi thể hiện kết quả ủ tế bào A549 trên bề mặt điện cực vàng đã được chức hóa sử dụng cầu SH-PEG-COOH và aptame đặc hiệu với dòng tế bào đích A549 với đối chứng bề mặt thủy tinh tại hai nồng độ aptame khi thực hiện ủ: (a) 25μM NH₂-Aptame; (b) 10μM NH₂-Aptame. Kết quả cho thấy với điện cực vàng, khả năng bắt giữ tế bào bởi aptame có hiệu quả hơn hẳn so với điện cực thủy tinh.

Hình 6 thể hiện kết quả thử nghiệm với kỹ thuật làm giàu tế bào theo giải pháp hữu ích, trong đó khi áp điện thế lên điện cực lần lượt từ phía ngoài vào phía trong (lần lượt theo hình 6a, 6b, 6c) mật độ tế bào được tập trung dần về phía điện cực bắt giữ (hình 6d).

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 bằng thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích, trong đó quy trình

này bao gồm các bước a) chuẩn bị thiết bị vi lỏng; b) cố định aptame vào khoang làm giàu; c) rửa khoang làm giàu; d) cấp mẫu cần phát hiện tế bào A549, e) làm giàu tế bào A549; f) loại bỏ tế bào không đặc hiệu; và g) xác định dòng tế bào A549.

Trong bước chuẩn bị thiết bị vi lỏng, thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích được chuẩn bị, trong đó các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi. Thiết bị đo ngoại vi có thể là thiết bị cấp điện áp và đo trở kháng vi sai, tùy theo mục đích và chức năng của từng cặp điện cực trên vi điện cực.

Trong bước cố định aptame vào khoang làm giàu, tiến hành bơm đồng thời dung dịch chứa aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 theo ống dẫn dung dịch thứ nhất qua kênh dẫn thứ nhất và bơm dung dịch đệm theo ống dẫn dung dịch thứ hai qua kênh dẫn thứ hai. Mục đích của quá trình này để pha loãng aptame đến nồng độ định trước. Dung dịch này được phối trộn trong buồng trộn vi lỏng và làm đầy khoang làm giàu. Sau đó tiến hành ủ trong khoảng 60 phút để aptame cố định trên bề mặt điện cực cảm biến.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch đệm được sử dụng trong bước cố định aptame được chọn từ nhóm các dung dịch bao gồm: HEPES(pH 7,5): 40mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂; PBS (pH 7,4): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄; Tris-HCl (pH 7,5): 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA; TE (pH 8,0): 10mM Tris, 1mM EDTA).

Theo một phương án ưu tiên, trong đó trước bước cố định aptame còn bao gồm bước chức hóa bề mặt điện cực cảm biến với cầu SH-PEG-COOH bằng cách đưa dung dịch SH-PEG-COOH vào thiết bị vi lỏng đồng thời thông qua các cửa nạp và kênh dẫn đến khoang làm giàu và ủ trong thời gian khoảng 60 phút.

Trong bước rửa khoang làm giàu, sau khi để aptame cố định trên bề mặt cảm biến, tiến hành bơm dung dịch PBS theo ống dẫn dung dịch thứ hai liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ 10 μ L/giây. Mục đích của quá trình này nhằm rửa các thành phần không cố định trên bề mặt điện cực cảm biến.

Trong bước cấp mẫu cần phát hiện tế bào A549, tiến hành thu nhận mẫu tế bào. Mẫu tế bào có thể là mẫu sinh thiết từ phổi bệnh nhân và được huyền phù hóa mẫu trong dung dịch đệm đến nồng độ chuẩn. Theo một phương án, lượng tế bào tổng số được sử dụng để phân tích được pha loãng đến khoảng từ 10^6 đến 10^9 tế bào/ml. Mẫu

tế bào này được cấp và khoang làm giàu thông qua cửa nạp với tốc độ $10\mu\text{L}/\text{giây}$ đến khi lấp đầy khoang làm giàu.

Trong bước làm giàu tế bào A549, tiến hành áp lực điện di điện môi (DEP) trên các tế bào bằng cách áp điện thế lên các cặp điện cực thao tác cạnh nhau theo hướng từ ngoài vào trong phía tâm để tập trung tế bào A549. Theo cách này, việc áp lần lượt điện áp từ ngoài vào phía tâm điện cực giúp “đẩy” tế bào tập trung vào phía tâm và điện cực đã được cố định aptame sẽ bắt cặp đặc hiệu với các tế bào A549. Quá trình này nhằm tăng lượng tế bào A549 tập trung (quá trình làm giàu). Bằng cách này sẽ tăng ngưỡng phát hiện tế bào. Sau đó ủ khoang làm giàu trong khoảng 60 phút để cố định tế bào A549 trên bề mặt điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó thời gian áp điện thế lên các điện cực thao tác cạnh nhau trong bước làm giàu tế bào A549 có thời gian khoảng 60 giây cho mỗi bước áp điện thế.

Trong bước loại bỏ tế bào không đặc hiệu, tiến hành bơm dung dịch PBS vào khoang làm giàu thông qua các cửa nạp liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ $10\mu\text{L}/\text{giây}$ để rửa các tế bào không bám đặc hiệu với aptame được cố định trên điện cực. Quá trình này chỉ giữ lại các tế bào bám đặc hiệu, nghĩa là các tế bào thuộc dòng tế bào A549 ung thư phổi.

Trong bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực, tiến hành đo trở kháng và đo trở kháng vi sai điện cực trung tâm, điện cực cảm biến và điện cực tham chiếu. Dựa trên kết quả chênh lệch trở kháng có thể xác định được lượng tế bào dòng A549 có trên bề mặt điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo trở kháng giữa điện cực cảm biến và điện cực trung tâm bởi thiết bị phân tích trở kháng (Impedance Analyzer) để so sánh giá trị chênh lệch trở kháng giữa hai điện cực từ đó định lượng được lượng tế bào có mặt ở điện cực cảm biến hoặc điện cực trung tâm.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo độ chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với điện cực cảm biến và điện cực trung tâm với điện cực tham chiếu thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực dưới 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 với đầu 5' được thế nhóm thiol (-SH) hoặc nhóm amin (-NH₂).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Sản xuất thiết bị vi lỏng để phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549

Tạo cấu trúc kênh dẫn lỏng của thiết bị vi lỏng

Để thực hiện chế tạo được kênh dẫn bằng vật liệu PDMS, các quy trình vi chế tạo dựa trên phương pháp quang khắc (photolithography) đã được thực hiện trên phiến Silic với chất cản quang photoresist âm tính dựa trên epoxy SU-8.

Chuẩn bị, làm sạch phiến silic bằng cách ngâm phiến trong dung dịch piranha (hỗn hợp dung dịch với tỷ lệ H₂SO₄:H₂O₂ = 3 : 1) ở nhiệt độ 120°C trong 2 giờ. Thực hiện quay phủ lớp chất cản quang SU-8 lên bề mặt phiến silic với các bước như sau: Bước 1 quay phủ ở tốc độ 500 vòng/phút trong 20 giây. Bước 2 quay phủ trong 35 giây ở tốc độ 1000 vòng/phút hoặc 2250 vòng/phút để tạo ra lớp SU-8 có độ dày tương ứng lần lượt là 100 µm và 50 µm.

Nung phiến silic đã được quay phủ SU-8 (2050, MicroChem Corp., Newton, MA, USA) từ nhiệt độ phòng lên đến 95 °C. Trong đó, cách mỗi 2 phút, tăng nhiệt độ thêm 5 độ. Bước tăng nhiệt độ từ 60 °C đến 65 °C được giữ trong khoảng thời gian 10 phút và bước tăng nhiệt độ từ 90 °C lên 95 °C được giữ trong thời gian 30 phút. Sau đó, phiến silic được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng trong tối thiểu 2 giờ đồng hồ.

Thực hiện phơi sáng phiến silic đã được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng dưới tia UV. Phiến silic được thiết lập cùng với mặt nạ với các cấu trúc xác định được đặt phía

trên phiến. Năng lượng phơi sáng được thiết lập theo yêu cầu của nhà cung cấp chất cản quang, trong trường hợp này, năng lượng được thiết lập ở mức 200 mJ/cm^2 .

Thực hiện nung nóng phiến vừa được phơi sáng từ nhiệt độ phòng lên đến 95°C . Trong đó, cách mỗi 2 phút, tăng nhiệt độ thêm 5°C . Bước tăng nhiệt độ từ 60°C đến 65°C được giữ trong khoảng thời gian 10 phút và bước tăng nhiệt độ từ 90°C lên 95°C được giữ trong thời gian 30 phút. Sau đó, phiến silic được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng trong tối thiểu 2 giờ đồng hồ.

Thực hiện hiện hình chất cản quang SU-8 bằng dung dịch hiện hình SU-8 Developer để rửa trôi những phần chất cản quang không mong muốn. Phần chất cản quang SU-8 còn lại sẽ được sử dụng để làm khuôn cho vi kênh lỏng.

Sau khi tạo thành công khuôn cho vi kênh bằng vật liệu SU-8, hỗn hợp polyme PDMS được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn hai phần PDMS (PDMS phần A và phần B, Sylgard-184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, Midland, MI, USA) theo tỷ lệ khối lượng là 10:1, và được khuấy đều trước khi đổ và khuôn kênh SU-8. Hỗn hợp PDMS được hút chân không để loại bỏ các bọt khí trong và trên mặt hỗn hợp polyme. Tiếp đó, cả khuôn kênh và hỗn hợp PDMS được nung nóng ở 65°C trong vòng 2 giờ để đông cứng hỗn hợp polyme PDMS. Sau đó, khuôn kênh và PDMS được hạ về nhiệt độ phòng và thực hiện tách khuôn. Các đường dẫn lối vào và lối ra cho vi kênh được tạo bằng phương pháp đục lỗ thủ công.

Tạo cấu trúc điện cực thao tác và điện cực cảm biến của thiết bị vi lỏng

Phương pháp quang khắc (photolithography) cần mặt nạ và nguồn sáng UV để tạo cấu trúc trên một lớp polyme cản quang với các cấu trúc và mục đích mong muốn phù hợp với các cấu trúc của mặt nạ. Tùy thuộc vào nhu cầu độ phân giải, mặt nạ có thể được in bằng tia laze trên nền trong suốt (1200 dpi hoặc độ phân giải $250 \mu\text{m}$), độ phân giải cao trên vật liệu phim trong suốt mỏng (10.000 dpi / $30 \mu\text{m}$) hoặc mặt nạ với cấu trúc được in bằng phương pháp lắng đọng Chromium trên thạch anh (420.000 dpi / 600 nm). Mặt nạ có độ phân giải cao nhất thường có giá thành đắt hơn và hạn chế kích thước của tổng thể thiết bị vi lỏng cỡ khoảng 100 mm mỗi cạnh.

Các cấu trúc vi điện cực được chế tạo dựa trên quy trình quang khắc (photolithography) và quy trình ăn mòn ướt cụ thể với các bước như sau:

Phủ quay lớp chất cản quang S1813 (Shipley 1813, MicroChem Co., Ltd., Westborough, MA, USA) lên bề mặt phiến thủy tinh đã được phun xạ lớp chromium

và lớp vàng trên bề mặt. Tốc độ quay phủ được thiết lập ở hai giai đoạn: tốc độ 700 vòng/phút trong 10 giây đầu quá trình và tốc độ 1700 vòng/phút trong 20 giây tiếp theo của quá trình tương ứng với việc tạo lớp chất cản quang dày 2 μm trên bề mặt phiến. Sau đó, phiến được nung nóng ở 90 °C trong 2 phút.

Thực hiện phơi sáng lớp cản quang vừa được quay phủ dưới ánh sáng UV ở mức năng lượng 90 mJ/cm². Thực hiện nung nóng phiến ở 90 °C trong 3 phút sau khi phơi sáng.

Chuẩn bị chất hiện hình bằng cách hòa dung dịch MP 351 với nước DI ở tỷ lệ 2 : 9. Thực hiện hiện hình các phần chất cản quang đã được ánh sáng UV kích hoạt trong bước phơi sáng bằng cách ngâm phiến trong dung dịch hiện hình trong khoảng 9 giây. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N₂. Sau đó, nung phiến ở 120 °C trong 3 phút để loại bỏ hoàn toàn hơi nước còn lại trên bề mặt phiến.

Thực hiện ăn mòn lớp vàng không bị chất cản quang che phủ bằng cách ngâm phiến trong dung dịch ăn mòn vàng (Gold Etchant) trong khoảng 15 giây. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N₂.

Thực hiện ăn mòn lớp chrominum không bị chất cản quang che phủ bằng cách ngâm phiến trong dung dịch ăn mòn Chrominum (Chrominum Etchant) trong khoảng 10 s. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N₂.

Loại bỏ lớp chất cản quang bằng cách rửa phiến lần lượt với dung dịch Acetone và Ethanol. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N₂.

Để tạo lớp cách ly giữa vi điện cực và môi trường kênh lỏng, buồng lỏng, một lớp chất cản quang có thể được tạo ra bằng phương pháp tương tự với mặt nạ được thiết kế riêng.

Tạo cấu trúc điện cực bao gồm các điện cực thao tác và điện cực cảm biến với cấu trúc kênh dẫn vi lỏng

Để PDMS chứa cấu trúc vi kênh lỏng sau khi hoàn thành sẽ không kết dính với các cấu trúc vật liệu khác và bề mặt thể hiện tính kỵ nước. Có một số phương pháp xử lý bề mặt PDMS để giảm tính kỵ nước đó và giúp PDMS có thể kết nối với vật liệu khác đó là phơi bề mặt vật liệu PDMS trong oxy plasma. Để đóng gói được phần cấu trúc vi kênh được chế tạo bằng vật liệu PDMS với phiến thủy tinh có cấu trúc vi điện cực kim loại, cả hai phiến PDMS và phiến thủy tinh được thực hiện oxy plasma để làm sạch và kích hoạt bề mặt sử dụng buồng plasma (Model PDC-32G, Harrick Plasma

Corp., Ithaca, NY, USA) trước khi được gắn với nhau. Để có thể gắn chính xác vi kênh với cấu trúc điện cực trên phiên thủy tinh, một camera theo dõi trong quá trình gắn đã được sử dụng để điều chỉnh vị trí của phiên vi kênh PDMS trước khi hai phiên thực sự được gắn với nhau. Bên cạnh đó, trong quá trình điều chỉnh vị trí để đóng gói vi kênh và cấu trúc điện cực, một lượng nhỏ methanol có thể được sử dụng để giữ hai bề mặt phân tách tạm thời trong thời gian ngắn trước khi được gắn kín với nhau thu được thiết bị với cấu trúc như thể hiện trên Hình 1.

Phủ cầu SH-PEG-COOH với điện cực cảm biến của thiết bị vi lỏng

Hòa tan COOH-PEG-Thiol (Sigma Aldrich) trong dung dịch nước DI tới nồng độ $0,4\mu\text{M}$, theo đó điều chế được chế phẩm phủ. Khoang làm giàu được nạp đầy bằng chế phẩm phủ cầu COOH-PEG-Thiol sao cho chế phẩm phủ cầu có thể tiếp xúc trực tiếp với điện cực bất giữ. Toàn bộ thiết bị vi lỏng được đặt ở nhiệt độ 4°C . Sau 17 giờ, rửa khoang làm giàu 104 bằng cách bơm đẩy chế phẩm phủ ra ngoài và nạp đầy buồng lần lượt bằng các dung dịch: PBS 1x, nước DI và Ethanol 70%, mỗi dung dịch ủ trong 10 phút trước khi bơm đẩy ra ngoài.

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 98% được pha loãng với nước DI về nồng độ 16% để hoạt hóa cho phản cho nhóm chức COOH của phân tử COOH-PEG-Thiol đã được phủ trên bề mặt điện cực vàng để tạo liên kết với aptame thông qua nhóm chức $-\text{NH}_2$. Chế phẩm dung dịch EDC được nạp đầy vào khoang làm giàu. Sau 30 phút, rửa khoang làm giàu bằng cách bơm đẩy chế phẩm EDC ra ngoài và nạp đầy buồng bằng dung dịch PBS 1x. Lặp lại thao tác rửa buồng bằng dung dịch PBS 1x 5 lần.

Kết quả thu được thiết bị vi lỏng đã được cố định cầu SH-PEG-COOH (cầu COOH-PEG-Thiol) trên bề mặt điện cực vàng để có thể bất giữ được aptame khi tiến hành phân tích.

Ví dụ 2. Thử nghiệm điều kiện cố định aptame lên điện cực bất giữ đã được phủ cầu COOH-PEG-Thiol

Aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 được sử dụng làm aptame bắt cặp đặc hiệu với dòng tế bào ung thư phổi A549.

Aptame được pha loãng với nước DI để đạt tới nồng độ $25\mu\text{M}$. Toàn bộ thiết bị vi lỏng được đặt ở nhiệt độ phòng 25°C . Khoang làm giàu 104 được nạp đầy bằng chế phẩm aptame có nồng độ $25\mu\text{M}$. Chế phẩm dung dịch aptame được nạp đầy khoang

làm giàu khoang làm giàu. Sau 30 phút, rửa khoang làm giàu 104 bằng cách bơm đầy chế phẩm dung dịch aptame ra ngoài và nạp đầy buồng bằng dung dịch PBS 1x. Lặp lại thao tác rửa buồng bằng dung dịch PBS 1x 5 lần.

Điều chế dung dịch chứa tế bào đích A549

Tế bào đích dòng ung thư phổi A549 được nuôi cấy trong tủ ẩm có điều kiện môi trường nhiệt độ 37°C và tỷ lệ CO₂ 5%. Sau khi lấy ra từ tủ ẩm, loại bỏ môi trường cũ, rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1x (khoảng 2 ml/10 cm² bề mặt nuôi cấy), thả dung dịch vào thành của chai nuôi cấy để tránh tác động trực tiếp lên lớp tế bào. Lắc nhẹ chai nuôi cấy vài lần. Loại bỏ dung dịch rửa, bổ sung dung dịch tách tế bào (đã được làm ấm ở 37 °C trước đó) vào thành chai nuôi cấy (trypsin 10 % với dòng tế bào A549). Sử dụng vừa đủ thể tích dung dịch tách (0.5 ml/10 cm²). Lắc nhẹ chai nuôi cấy vài lần. Ủ chai nuôi cấy trong tủ ẩm 37 °C trong thời gian 3 phút 30 giây. Kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược xem mức độ tách khỏi mặt đáy của tế bào. Nếu dưới 90 % tế bào tách thì để thêm thời gian ủ khoảng vài phút nữa. Kiểm tra sự tách tế bào trong mỗi 30 giây. Có thể gõ nhẹ vào đĩa để tăng hiệu quả tách tế bào. Khi hơn 90% tế bào tách, bổ sung môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (gồm 1 % kháng sinh, 9 % FBS, 90 % môi trường nuôi cấy DMEM ứng với dòng tế bào A549) đã được làm ấm với thể tích gấp 2 lần thể tích dung dịch tách. Trải đều môi trường lên bề mặt lớp tế bào vài lần. Chuyển toàn bộ dung dịch tế bào sang ống 15 ml và ly tâm tại 500 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ môi trường nuôi cấy nổi có enzyme. Chuyển phần dung dịch chứa tế bào vào ống Eppendorf 1,5 ml.

Ủ dung dịch chứa tế bào đích trong khoang làm giàu

Thiết bị vi lỏng được chuẩn bị theo Ví dụ 1 được làm sạch bằng cách nạp đầy bằng dung dịch PBS 1x khoảng 5 lần. Tế bào A549 được chuẩn bị như trên được bơm trực tiếp để ủ trong khoang làm giàu sao cho dung dịch chứa tế bào tiếp xúc đồng thời với vùng điện cực và vùng đế thủy tinh thông thường ở nhiệt độ phòng 25 °C trong thời gian 3 phút với số lượng tế bào khảo sát là 10⁴ tế bào. Sau thời gian ủ 3 phút, buồng vi lỏng tiếp tục được làm sạch bằng cách nạp đầy dung dịch PBS 1x và loại bỏ các tế bào liên kết không đặc hiệu với bề mặt điện cực vàng.

Kết quả thể hiện trên Hình 5 cho thấy với hai nồng độ dung dịch aptame khác nhau bao gồm 25μM NH₂-Aptame và 10μM NH₂-Aptame. Dựa trên kết quả hình ảnh kính hiển vi trước và sau khi rửa bằng dung dịch PBS 1x, có thể thấy rằng các tế bào

không bám dính hoặc bám dính không đặc hiệu với bề mặt vàng đã được chức hóa aptame đã bị rửa trôi sau khi thực hiện thao tác rửa. Còn lại là những tế bào đích bám dính đặc hiệu với bề mặt vàng đã được chức hóa bằng aptame. Khi thực hiện ủ bề mặt điện cực với hai nồng độ dung dịch aptame khác nhau với cùng một số lượng tế bào đưa vào buồng vi lỏng, nồng độ 25 μ M NH₂-Aptame cho thấy hiệu suất bắt giữ đặc hiệu với các tế bào A549 cao hơn so với nồng độ 10 μ M NH₂-Aptame. Trong trường hợp điện cực được chế tạo trên đế thủy tinh, đế thủy tinh được sử dụng như là một đối chứng cho kết quả của thí nghiệm. Có thể thấy với cả hai nồng độ dung dịch aptame 25 μ M NH₂-Aptame và 10 μ M NH₂-Aptame, số lượng tế bào còn bám dính lại bề mặt thủy tinh là rất ít, cho thấy tính đặc hiệu khi bắt giữ tế bào của điện cực đã được chức hóa.

Ví dụ 3. Phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 bằng thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích

Chuẩn bị dòng tế bào ung thư phổi A549

Tế bào đích dòng ung thư phổi A549 được nuôi cấy trong tủ ấm trong điều kiện môi trường nhiệt độ 37°C và tỷ lệ CO₂ 5%. Sau khi lấy ra từ tủ ấm, loại bỏ môi trường cũ, rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1x (khoảng 2 ml/10 cm² bề mặt nuôi cấy), thả dung dịch vào thành của chai nuôi cấy để tránh tác động trực tiếp lên lớp tế bào. Lắc nhẹ chai nuôi cấy vài lần. Loại bỏ dung dịch rửa, bổ sung dung dịch tách tế bào (đã được làm ấm ở 37 °C trước đó) vào thành chai nuôi cấy (trypsin 10 % với dòng tế bào A549). Sử dụng vừa đủ thể tích dung dịch tách (0.5 ml/10 cm²). Lắc nhẹ chai nuôi cấy vài lần. Ủ chai nuôi cấy trong tủ ấm 37 °C trong thời gian 3 phút 30 giây. Kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược xem mức độ tách khỏi mặt đáy của tế bào. Nếu dưới 90 % tế bào tách thì để thêm thời gian ủ khoảng vài phút nữa. Kiểm tra sự tách tế bào trong mỗi 30 giây. Có thể gõ nhẹ vào đĩa để tăng hiệu quả tách tế bào. Khi hơn 90% tế bào tách, bổ sung môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (gồm 1 % kháng sinh, 9 % FBS, 90 % môi trường nuôi cấy DMEM ứng với dòng tế bào A549) đã được làm ấm với thể tích gấp 2 lần thể tích dung dịch tách. Trải đều môi trường lên bề mặt lớp tế bào vài lần. Chuyển toàn bộ dung dịch tế bào sang ống 15 ml và li tâm tại 500 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ môi trường nuôi cấy nổi có enzyme. Chuyển phần dung dịch chứa tế bào vào ống Eppendorf 1,5 ml.

Cấp dung dịch chứa dòng tế bào đích A549 vào buồng trộn vi lỏng và khoang làm giàu

Lấy 60 μ l dung dịch chứa tế bào được chuẩn bị ở trên cấp vào buồng trộn vi lỏng thông qua cửa vào thứ nhất và kênh dẫn lối vào thứ nhất của thiết bị vi lỏng phát hiện tế bào đích A549. Lấy 60 μ l dung dịch Sucroza 8,6% cấp vào buồng trộn vi lỏng thông qua cửa vào thứ hai và kênh dẫn lối vào thứ hai của thiết bị vi lỏng phát hiện tế bào đích A549. Hai dung dịch trên được đưa vào thiết bị vi lỏng thông qua thiết bị vi bơm được kết nối với ống dẫn dung dịch mẫu và được thiết lập ở tốc độ bơm vi lỏng 100 μ l/phút. Sau khi dung dịch mẫu và dung dịch đậm sucroza 8,6% được trộn ở buồng trộn vi lỏng, khoang làm giàu đích tiếp tục được nạp đầy bởi sản phẩm trộn của buồng trộn vi lỏng bao gồm tế bào đích A549 trong dung dịch sucroza 8,6%.

Làm giàu tế bào trong khoang làm giàu

Sau khi buồng làm giàu vào phát hiện tế bào được nạp đầy dung dịch sucroza 8,6 % chứa tế bào đích. Thiết bị được giữ nguyên trong 15 phút để các tế bào trôi nổi lắng xuống đáy kênh. Các điện cực thao tác được kết nối với nguồn phát tín hiệu xoay chiều ở tần số 1 MHz, biên độ 5 Vp-p để thực hiện thao tác làm giàu tế bào. Các cặp điện cực cạnh nhau lần lượt từ điện cực phía ngoài vào điện cực phía trong được đặt tín hiệu điện thế xoay chiều để tạo ra lực điện di điện môi bước tác động lên các tế bào đã lắng đọng ở đáy buồng. Trong đó, thời gian áp dụng tín hiệu điện thế bước ở mỗi cặp điện cực thao tác là 10 giây. Thao tác tập trung tế bào sử dụng điện trường bước được tác động lần lượt cho tới khi tín hiệu điện thế được đặt tới điện cực trung tâm. Khi ấy, các tế bào sẽ di chuyển qua điện cực bắt giữ. Trong đó, các tế bào đích A549 sẽ tương tác với aptame được gắn trên điện cực bắt giữ và sẽ được giữ lại.

Kết quả được thể hiện trên các Hình 7 và 8, theo đó cho thấy khả năng phát hiện tế bào A549 trên vùng cảm biến của cấu trúc điện cực trong buồng vi lỏng sau khi thực hiện làm giàu tế bào ứng với số lượng tế bào khác nhau. Kết quả cho thấy trở kháng giữa hai điện cực cảm biến được phân tích với tần số tín hiệu quét từ 10 KHz cho tới 1 MHz. Trên các hình 8 A, B, C và D cho thấy số lượng tế bào được thao tác tập trung vào khu vực điện cực cảm biến tăng dần sau mỗi lượt áp dụng điện trường bước quét tế bào trong buồng vi lỏng. Ứng với mỗi lượng tế bào được tập trung tại điện cực cảm biến như trên hình phụ A, B, C, D, trở kháng được thể hiện trên đồ thị Hình. 7. Có thể thấy rằng, mặc dù giá trị trở kháng không khác nhau nhiều khi xét tổng thể, nhưng giá

trị tổng trở kháng sẽ tăng dần từ khoảng 31,4 K Ω đến 32,1 K Ω khi số lượng tế bào xuất hiện trên điện cực cảm biến thay đổi từ 2 tế bào đến 16 tế bào ứng với tần số tín hiệu tại 550 KHz. Bên cạnh đó, Hình 9 thể hiện kết quả phát hiện tế bào dựa trên phương pháp phân tích trở kháng tại các tần số kích thích khác nhau ứng với số lượng tế bào khác nhau trong buồng vi lỏng. Có thể thấy rằng, khi tần số tín hiệu kích thích sử dụng trong các phép đo trở kháng thay đổi, độ thay đổi trở kháng giữa các điện cực cũng thay đổi theo. Hơn nữa, sự thay đổi trở kháng này còn phụ thuộc mạnh mẽ vào số lượng tế bào xuất hiện ở khu vực cảm biến. Ứng với trường hợp có 16 tế bào xuất hiện ở khu vực cảm biến, độ thay đổi trở kháng là gần 2500 Ω ứng với tần số kích thích là 200 KHz và con số này là khoảng 500 Ω ứng với tần số kích thích là 800 KHz. Như vậy, kết quả cho thấy khả năng phát hiện tế bào dựa trên phương pháp phân tích trở kháng tại các tần số kích thích khác nhau ứng với số lượng tế bào khác nhau trong buồng vi lỏng.

Phát hiện tế bào đã được làm giàu và bắt giữ trong khoang làm giàu

Sau khi toàn bộ tế bào trong khoang làm giàu đã được thao tác, làm giàu tới điện cực bắt giữ, thiết bị sẽ được giữ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng 25 °C để tăng thời gian tương tác giữa các tế bào đích A549 với bề mặt điện cực đã được chức hóa bằng aptame đặc hiệu với tế bào đích A549.

Phát hiện tế bào bằng cách sử dụng máy phân tích trở kháng (Impedance Analyzer – 6420).

Tiếp theo, hỗn dịch và tế bào trong khoang làm giàu được đưa ra ngoài thông qua kênh dẫn lối ra và cửa ra. Khoang làm giàu được rửa bằng dung dịch sucroza 8,6% bằng cách bơm dung dịch sucroza 8,6% vào các cửa vào với tốc độ 100 μ l/phút trong thời gian 10 phút. Việc này đảm bảo cho các tế bào không bám dính hoặc bám dính không đặc hiệu với bề mặt điện cực bắt giữ được rửa trôi trước khi thực hiện phép đo trở kháng giữa điện cực bắt giữ và điện cực trung tâm. Tiếp theo, các điện cực trung tâm và điện cực bắt giữ được kết nối tới điện cực L và H của máy phân tích trở kháng (Impedance Analyzer – 6420). Tần số quét của máy phân tích trở kháng được đặt từ 10 KHz tới 1 MHz. Điện thế kích thích đặt ở 1 Vp-p. Dữ liệu về giá trị trở kháng phụ thuộc theo tần số được truyền tới máy tính để xử lý và lưu trữ thông qua phần mềm LabView.

Phát hiện tế bào bằng cách sử dụng mạch cảm tay đo trở kháng vi sai

Tiếp theo, hỗn dịch và tế bào trong khoang làm giàu được đưa ra ngoài thông qua kênh dẫn lối ra và cửa ra. Khoang làm giàu được rửa bằng dung dịch sucroza 8,6% bằng cách bơm dung dịch sucroza 8,6% vào các cửa vào với tốc độ 100 μl /phút trong thời gian 10 phút. Việc này đảm bảo cho các tế bào không bám dính hoặc bám dính không đặc hiệu với bề mặt điện cực bắt giữ được rửa trôi trước khi thực hiện phép đo trở kháng giữa điện cực bắt giữ và điện cực trung tâm. Tiếp theo, các điện cực trung tâm và điện cực bắt giữ được kết nối tới lối vào cảm biến của mạch đo trở kháng vi sai. Tần số quét của máy phân tích trở kháng được đặt từ 10 KHz tới 1 MHz. Điện thế kích thích đặt ở 1 Vp-p. Dữ liệu về giá trị trở kháng phụ thuộc theo tần số được truyền tới máy tính để xử lý và lưu trữ thông qua phần mềm LabView.

Hình 10 thể hiện kết quả sau khi thực hiện thành công việc sử dụng mạch phát hiện trở kháng vi sai. Kết quả cho thấy khả năng phát hiện tế bào dựa trên phương pháp trở kháng vi sai tại các số lượng tế bào khác nhau trong buồng vi lỏng. Bằng cách sử dụng mạch điện tích hợp bộ khuếch đại dụng cụ và bộ khuếch đại lock-in có khả năng phát hiện tín hiệu nhỏ trong nền nhiễu lớn kết hợp cùng với kỹ thuật trở kháng vi sai, mạch điện cho phép cung cấp giá trị điện thế lối ra phụ thuộc vào số lượng tế bào chênh lệch giữa hai cặp điện cực cảm biến. Sau khi thực hiện thành công việc thao tác làm giàu tế bào tại điện cực cảm biến với kết quả thể hiện trên Hình. 10, trở kháng giữa hai cặp điện cực cảm biến được khuếch đại vi sai bằng cách sử dụng bộ khuếch đại dụng cụ. Kết quả trên các Hình 10 A, B, C, D cho thấy số lượng tế bào được thao tác tập trung vào khu vực điện cực cảm biến tăng dần sau mỗi lượt áp dụng điện trường bước quét tế bào trong buồng vi lỏng. Ứng với mỗi lượng tế bào được tập trung tại điện cực cảm biến như trên các Hình 10 A, B, C, D, cho thấy có sự chênh lệch về trở kháng giữa hai cặp điện cực sẽ được phân tích và xử lý và cuối cùng được thể hiện trên đồ thị Hình 10 dưới dạng tín hiệu điện thế. Có thể thấy rằng, độ thay đổi điện thế lối ra phụ thuộc tỷ lệ thuận với số lượng tế bào chênh lệch giữa hai cặp điện cực khi sử dụng phương pháp vi sai. Điện thế lối ra thay đổi lên tới 48 mV ứng với trường hợp có 18 tế bào chênh lệch giữa hai cặp điện cực cảm biến với nhau.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích cho phép phát hiện lượng nhỏ dòng tế bào ung thư phổi A549 cho phép ứng dụng trong chẩn đoán sớm bệnh ung thư phổi. Thiết

bị cho phép phân tích đặc hiệu dựa trên khả năng tập trung tế bào bằng điện trường và vi phân tích, giúp tăng hiệu suất phát hiện tế bào đặc hiệu.

Bằng các bố trí các vi kênh và thiết kế điện cực theo kiểu hình tròn đồng tâm, thiết bị vi lỏng theo giải pháp hữu ích cho phép phân tích với một lượng nhỏ mẫu cũng như có khả năng phân tích hiệu suất cao với khả năng làm giàu và so sánh độ chênh lệch trở kháng giữa các điện cực cùng với khả năng bắt cặp đặc hiệu của các aptame, điều này cho phép không chỉ tăng hiệu suất phát hiện mà còn giúp giảm giá thành và chẩn đoán sớm bệnh ung thư phổi. Ngoài ra, với cách thiết kế vi kênh gồm nhiều cửa nạp cũng như khả năng tập trung tế bào cao nhờ điện trường, thiết bị cho phép tự động hóa quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi và giảm thời gian xét nghiệm.

Việc bố trí thiết kế điện cực theo kiểu hình tròn đồng tâm cho phép thiết bị có khả năng thao tác tập trung làm giàu và thực hiện phân tích trở kháng từ một tế bào đơn lẻ cho đến nhiều tế bào sau khi được bẫy vào khu vực điện cực cảm biến, đây được xem như là một cách đánh giá khả năng vượt trội của thiết bị so với các nghiên cứu và thiết bị khác. Jhih-Lin Hong và cộng sự cũng đã từng phát triển một hệ thống thực hiện bẫy tế bào vào khu vực cảm biến và đo phổ trở kháng của dòng tế bào ung thư với tần số phân tích từ 20 KHz đến 100 KHz, tuy nhiên hệ thống của Hong đề xuất chỉ cho phép bẫy và thực hiện phép đo trở kháng trên 1 tế bào đơn lẻ (Hong, Lan, & Jang, 2012). Kết quả nghiên cứu của Hong cho thấy trở kháng của đơn tế bào ung thư phổi A549 tại tần số 100 KHz là khoảng 2900 Ω trong khi kết quả hệ thống đề xuất có thể phân tích trở kháng của hai tế bào tại tần số 200 KHz là khoảng 1000 Ω , khi số lượng tế bào tăng thì trở kháng ghi nhận được tăng trung bình 170 Ω /tế bào. Trước đó, vào năm 2009, nhóm nghiên cứu của Younghak Cho và cộng sự đã thực hiện đề xuất thành công thiết bị phân tích phổ trở kháng đơn tế bào ung thư di căn (Cho et al., 2009). Thiết bị này bẫy đơn tế bào vào các hốc được điều khiển bằng áp suất âm trước khi thực hiện phân tích trở kháng trong khoảng 50 kHz – 2 MHz trên chính tế bào bị bẫy đó. Tuy nhiên, hệ thống đề xuất của Cho chỉ sử dụng trong việc phân tích đơn tế bào, chưa được tối ưu cho việc phân tích đa tế bào như hệ thống đề xuất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thiết bị vi lỏng để phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549, trong đó thiết bị này bao gồm phần đế (110) được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh (111) có khoang làm giàu (104) và vi điện cực (108) được bố trí khớp với khoang làm giàu (104) này, giữa vi điện cực (108) và khoang làm giàu (104) được cách nhau bởi lớp cách ly (107), điện cực được kết nối với bên ngoài bởi hệ dây dẫn (109) kết nối với thiết bị ngoại vi, trong đó:

Phần đế (110) được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng;

Khối chứa cấu trúc vi kênh (111) được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS), trên đó có cấu trúc vi kênh được khắc trên một mặt của khối bao gồm các kênh dẫn (102) nối với buồng trộn vi lỏng (103) đến khoang làm giàu (104) hình tròn đến kênh thoát (105), phía đầu các kênh dẫn (102) có bố trí các cửa nạp (101) và kênh thoát (105) có bố trí cửa thoát (106), các cửa nạp (101) và cửa thoát (106) này được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh (111) đến mặt còn lại của khối, các cửa nạp (101) và cửa thoát (106) được gắn với các đầu kết nối chữ L (113) và gắn với các đường dẫn mẫu (112);

Thiết bị này có từ 1 đến 10 cửa nạp (101) được bố trí độc lập và có các kênh dẫn (102) tương ứng dẫn vào buồng trộn vi lỏng (103);

Buồng trộn vi lỏng (103) có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn (102) để trộn đều vật liệu cấp từ các kênh dẫn (102) này;

Lớp cách ly (107) được bố trí giữa vi điện cực (108) và khoang làm giàu (104) được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS) có độ dày khoảng 1μm;

Vi điện cực (108) được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình tròn với đường kính bằng đường kính khoang làm giàu (104), trên vi điện cực (108) này bao gồm điện cực trung tâm (117) có dạng hình tròn nằm ở tâm của cấu trúc vi điện cực (108), tiếp đó là các điện cực cảm biến (115) và điện cực tham chiếu (116) là các dải nửa hình tròn bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm (117) và các điện cực thao tác (114) là các dải hình tròn hở đồng tâm bao quanh điện cực cảm biến (115) và điện cực tham chiếu (116), đầu của các điện cực này được gắn lần lượt với hệ dây

dẫn (109) để độc lập kết nối với thiết bị ngoại vi, trên điện cực cảm biến (115) được chức hóa để bắt cặp với các aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2; và

Hệ dây dẫn (109) được bố trí sát phần đế thủy tinh, trong đó hệ dây dẫn này kết nối các đầu điện cực trung tâm (117), điện cực cảm biến (115), điện cực tham chiếu (116), điện cực thao tác (114) để độc lập kết nối các điện cực này với thiết bị ngoại vi;

khi được lắp ghép, hệ dây dẫn (109) nối với các điện cực trên vi điện cực (108) được đặt sát với phần đế (110), tiếp đó phần đế (110) này được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh (111) sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh được ép kín với phần đế (110) và vi điện cực (108) nằm chính giữa khoang làm giàu (104) và được ngăn cách với không gian của khoang làm giàu (104) bởi lớp cách ly (107), tạo cấu trúc vi kênh kín, phía đầu các kênh dẫn (102) và kênh thoát (105) được gắn với các đầu kết nối chữ L (113) thông qua các cửa nạp (101) và cửa thoát (106), đầu còn lại của đầu kết nối chữ L (113) được nối với các đường dẫn mẫu tạo thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh;

theo đó, khi thực hiện phát hiện tế bào ung thư phổi A549, mẫu aptame được bơm vào đường dẫn mẫu qua cửa nạp (101) đi qua buồng trộn vi lỏng (103) đến khoang làm giàu (104) để cố định các aptame trên điện cực cảm biến (115), sau khi rửa phần dư, mẫu phát hiện được bơm tiếp qua cửa nạp (101) đến đầy khoang làm giàu (104), đồng thời áp điện thế vào các điện cực thao tác (114) lần lượt theo hướng từ ngoài vào tâm để làm giàu tế bào ung thư phổi A549 và đo trở kháng và trở kháng vi sai để xác định tế bào ung thư phổi A549.

2. Thiết bị theo điểm 1, trong đó khoang làm giàu (104) có chiều cao khoảng 50 μm , bán kính khoang làm giàu (104) này khoảng 500 μm và vi điện cực (108) trong khoang làm giàu (104) có chiều dày khoảng 1 μm .

3. Thiết bị theo điểm 1, trong đó số lượng điện cực thao tác (114) có từ 1 đến 50 điện cực có độ rộng mỗi điện cực khoảng 50 micromet được bố trí trên các cung tròn cách đều nhau hướng tâm bao quanh điện cực trung tâm (117) ở tâm vi điện cực (108).

4. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó điện cực cảm biến (115) được chức hóa bằng cầu nối SH-PEG-COOH trên cơ sở chất xúc tác EDC/NHS với các nồng độ khác nhau để gắn kết đặc hiệu với aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 đặc hiệu với dòng tế bào ung thư phổi A549.

5. Quy trình phát hiện dòng tế bào ung thư phổi A549 bằng thiết bị vi lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị thiết bị vi lỏng như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 trong đó các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi;
- b) cố định aptame vào khoang làm giàu bằng cách bơm đồng thời dung dịch chứa aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 theo ống dẫn dung dịch thứ nhất qua kênh dẫn thứ nhất và bơm dung dịch đệm theo ống dẫn dung dịch thứ hai qua kênh dẫn thứ hai để phối trộn với nồng độ định trước trong buồng trộn vi lỏng và làm đầy khoang làm giàu, tiến hành ủ trong khoảng 60 phút để aptame cố định trên bề mặt điện cực cảm biến;
- c) rửa khoang làm giàu bằng cách bơm dung dịch PBS theo ống dẫn dung dịch thứ hai liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ 10 μL /giây để rửa các thành phần không cố định trên bề mặt điện cực cảm biến;
- d) cấp mẫu cần phát hiện tế bào A549 bằng cách huyền phù hóa mẫu trong dung dịch đệm và cấp vào khoang làm giàu thông qua cửa nạp với tốc độ 10 μL /giây đến khi lấp đầy khoang làm giàu;
- e) làm giàu tế bào A549 bằng cách áp lực điện di điện môi (DEP) trên các tế bào bằng cách áp điện thế lên các cặp điện cực thao tác cạnh nhau theo hướng từ ngoài vào trong phía tâm để tập trung tế bào A549 vào các điện cực đã được cố định aptame bất cặp đặc hiệu với tế bào A549, sau đó ủ khoang làm giàu trong khoảng 60 phút để cố định tế bào A549 trên bề mặt điện cực;
- f) loại bỏ tế bào không đặc hiệu bằng cách bơm dung dịch PBS vào khoang làm giàu thông qua các cửa nạp liên tục trong thời gian 10 phút với tốc độ 10 μL /giây để rửa các tế bào không bám đặc hiệu với aptame được cố định trên điện cực; và
- g) xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực bằng cách đo trở kháng và đo trở kháng vi sai điện cực trung tâm, điện cực cảm biến và điện cực tham chiếu từ đó xác định được dòng tế bào A549 có trên bề mặt điện cực.

6. Quy trình theo điểm 5, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo trở kháng giữa điện cực cảm biến và điện cực trung tâm bởi thiết bị phân tích trở kháng (Impedance Analyzer) để so sánh giá trị chênh

lệch trở kháng giữa hai điện cực từ đó định lượng được lượng tế bào có mặt ở điện cực cảm biến hoặc điện cực trung tâm.

7. Quy trình theo điểm 5 hoặc 6, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

8. Quy trình theo điểm 7, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

9. Quy trình theo điểm 5, trong đó bước xác định dòng tế bào A549 trên bề mặt điện cực được thực hiện bằng cách đo độ chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với điện cực cảm biến và điện cực trung tâm với điện cực tham chiếu thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi.

10. Quy trình theo điểm 9, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực nhỏ hơn 10 V.

11. Quy trình theo điểm 10, trong đó tần số tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực dưới 1 MHz.

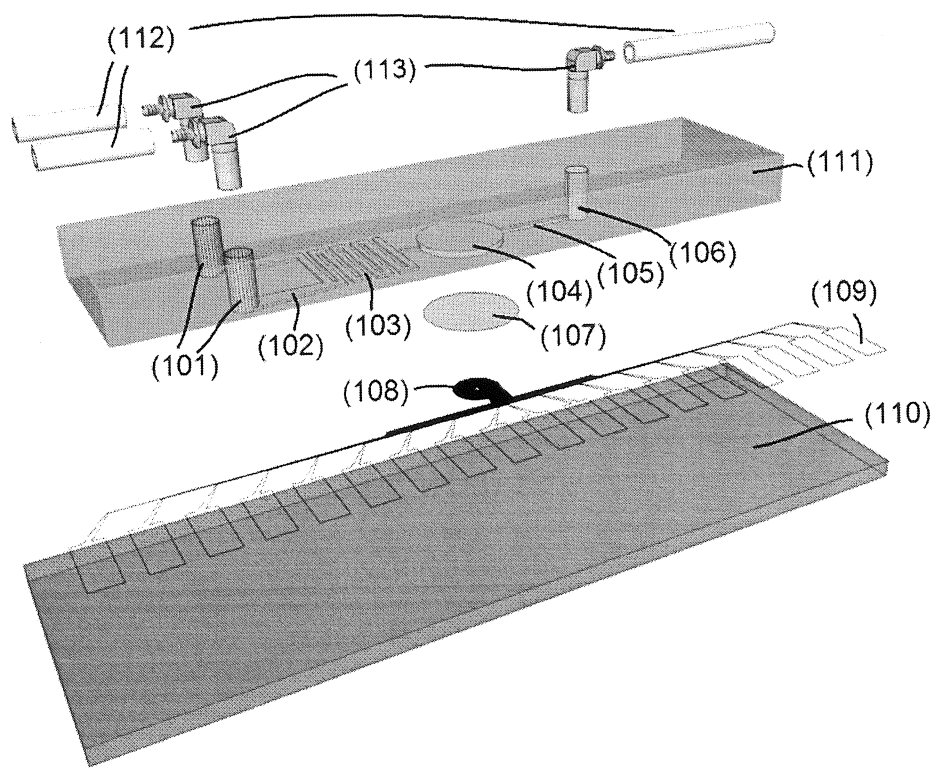
12. Quy trình theo điểm 5, trong đó aptame có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.2 với đầu 5' được thế nhóm thiol (-SH) hoặc nhóm amin (-NH₂).

13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 12, trong đó dung dịch đệm được sử dụng trong bước cố định aptame được chọn từ nhóm các dung dịch bao gồm: HEPES (pH 7,5): 40mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂; PBS (pH 7,4): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄; Tris-HCl (pH 7,5): 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA; TE (pH 8,0): 10mM Tris, 1mM EDTA).

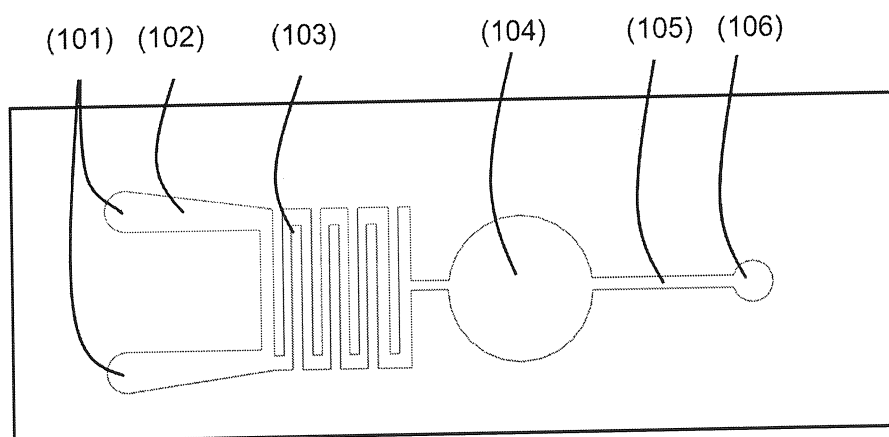
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 13, trong đó thời gian áp điện thế lên các điện cực thao tác cạnh nhau trong bước làm giàu tế bào A549 có thời gian khoảng 60 giây cho mỗi bước áp điện thế.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trước bước cố định aptame còn bao gồm bước chức năng hóa bề mặt điện cực cảm biến với cầu SH-PEG-COOH bằng cách đưa dung dịch SH-PEG-COOH vào thiết bị vi lỏng đồng thời thông qua các cửa nạp và kênh dẫn đến khoang làm giàu và ủ trong thời gian khoảng 60 phút

HÌNH 1

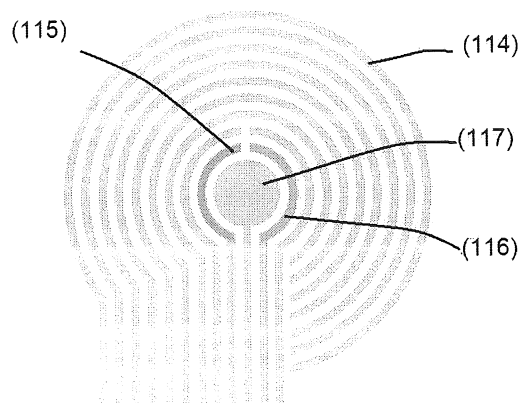


A

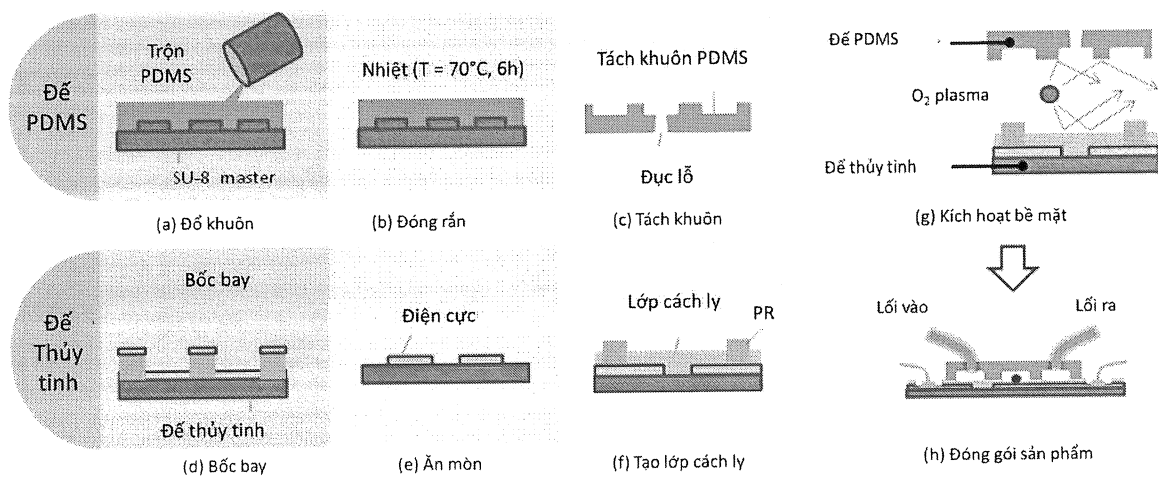


B

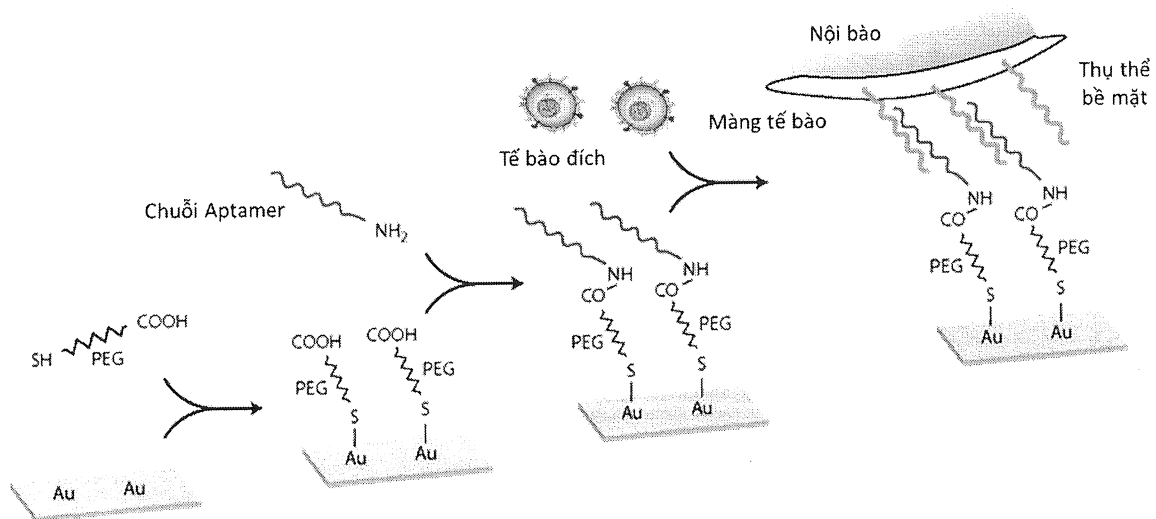
HÌNH 2



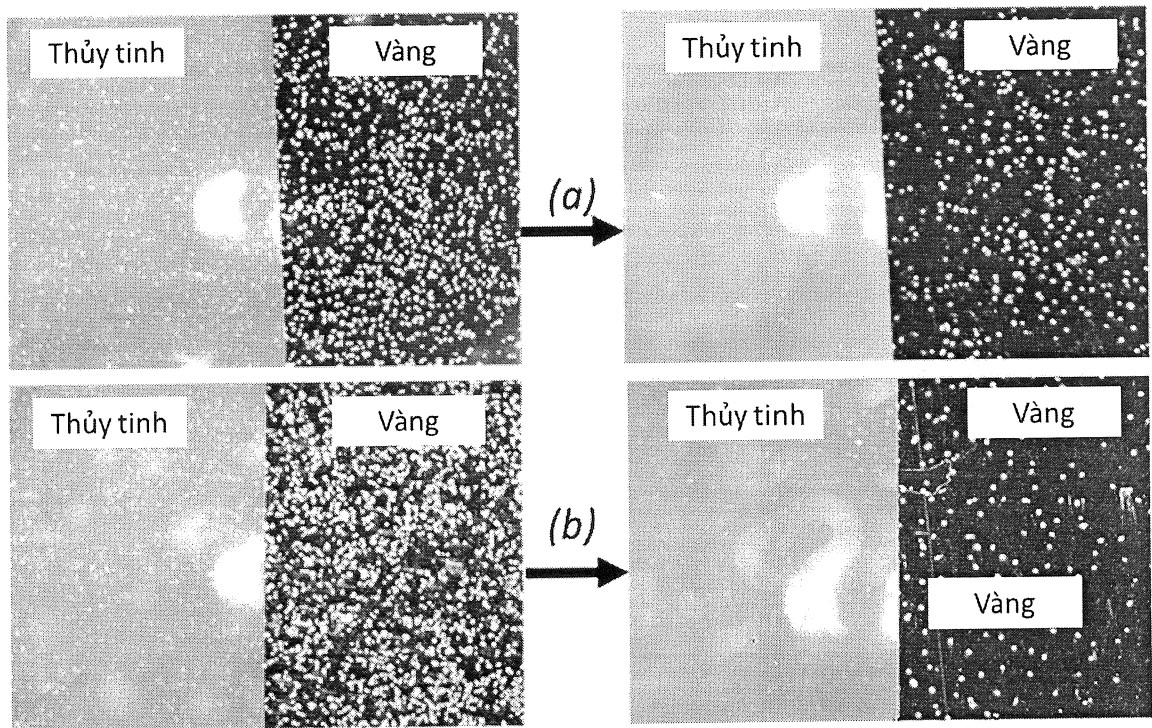
HÌNH 3



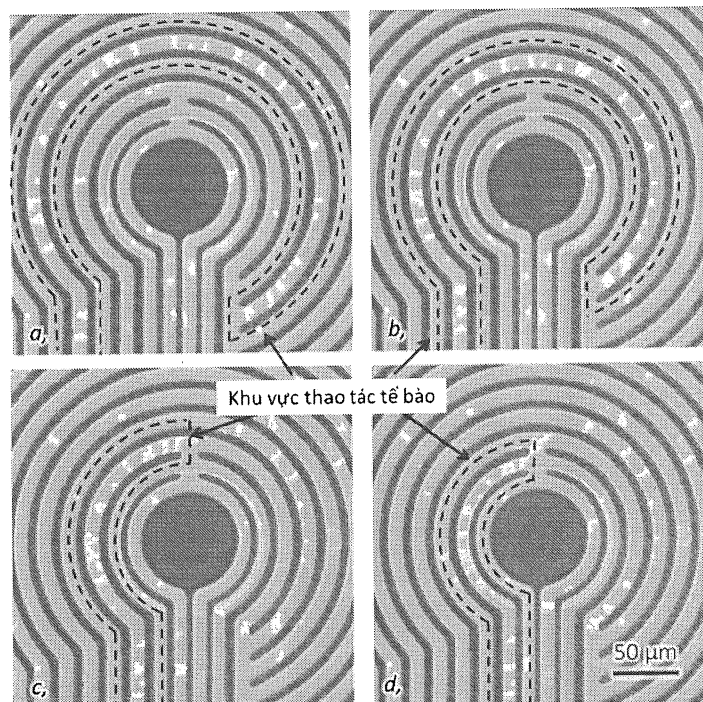
HÌNH 4



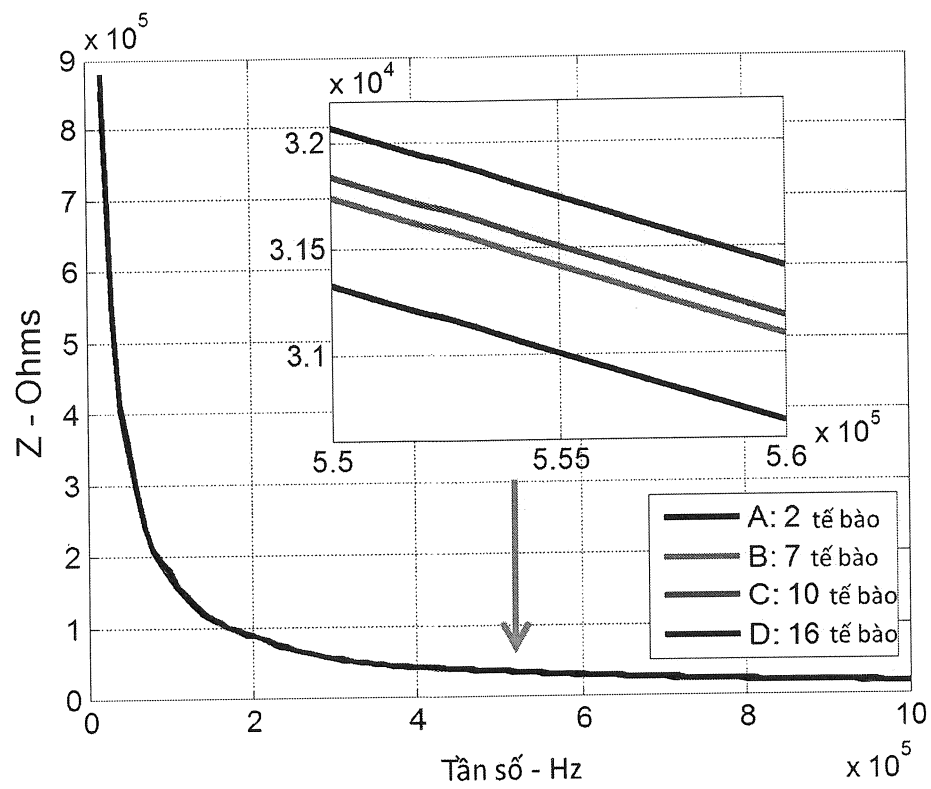
HÌNH 5



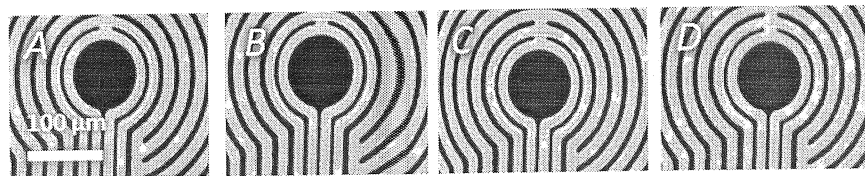
HÌNH 6

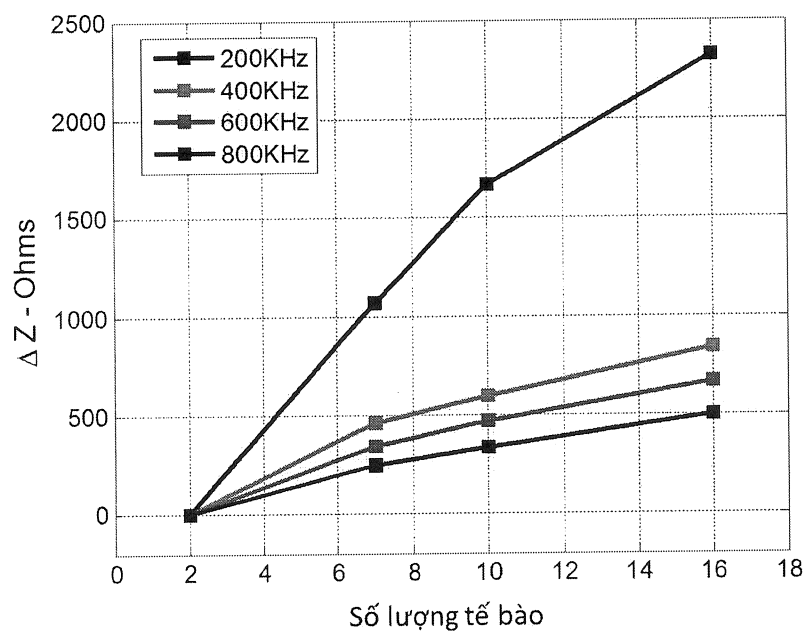


HÌNH 7

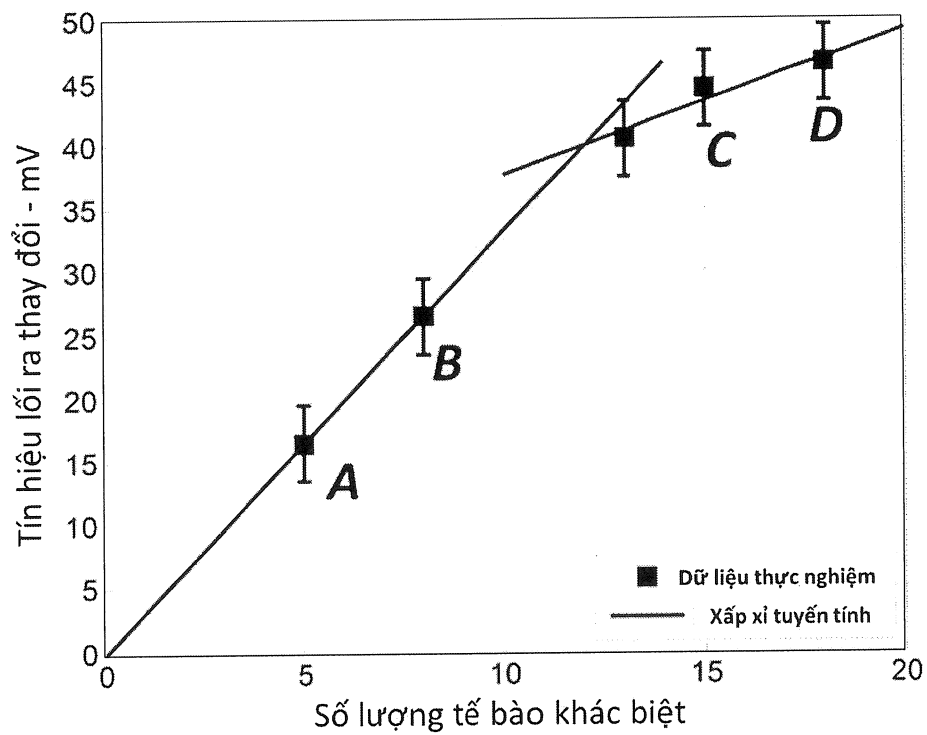


HÌNH 8

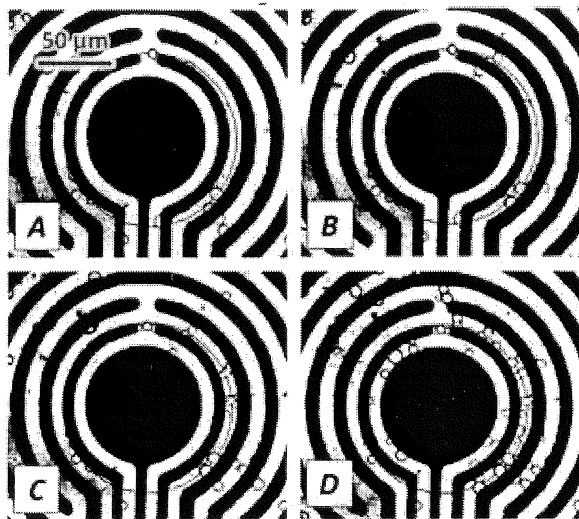




HÌNH 9



HÌNH 10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Đại học công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> THIẾT BỊ VI LỒNG ĐỂ PHÁT HIỆN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI A549 VÀ
 QUY TRÌNH PHÁT HIỆN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI NÀY

<130>

<160>2

<170>

<210> 1

<211> 84

<212> Nucleotit

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Aptame

<220>

<400>

ACGCTCGGAT GCCACTACAG GGTTCATGC CGTGGGGAGG GGGGTGGGT TTATAGCGTA	60
CTCAGCTCAT GGACGTGCTG GTGAC	85

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Aptame

<220>

<400> 2

ACGCTCGGATGCCACTACAGGGTTGCATGC CGTGGGGAGGGGGTGGGTTTTATAGCGTA	60
CTCAGCTCATGGACGTGCTG GTGA	84