



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0034959

(51)⁷ G01N 27/00; C08K 3/04; C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2018-02081

(22) 17/05/2018

(45) 27/03/2023 420

(43) 27/08/2018 365A

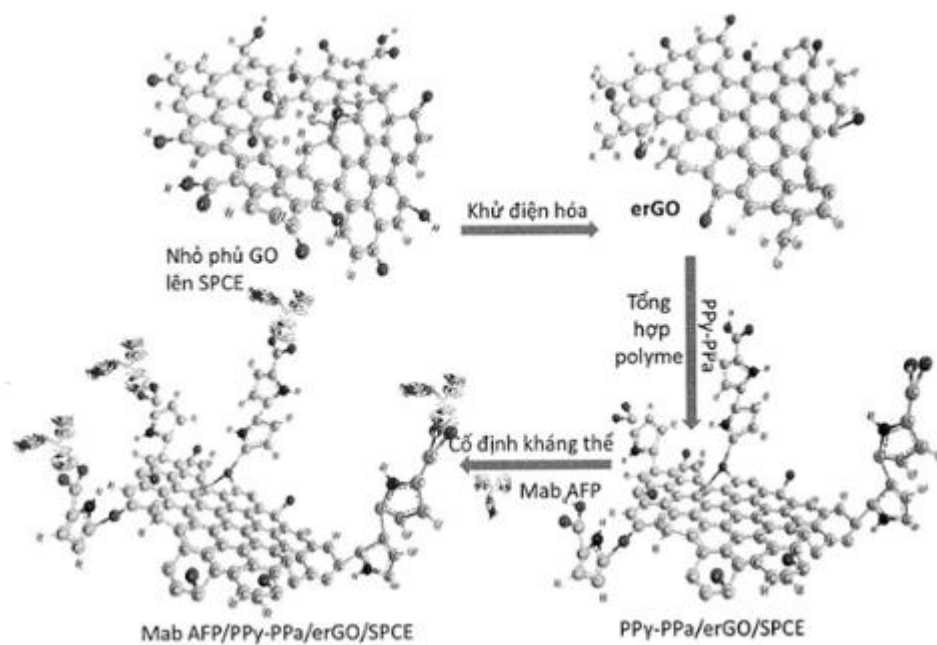
(73) Trường Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Trương Thị Ngọc Liên (VN); Đỗ Thị Ngọc Trâm (VN).

(54) QUY TRÌNH TỔNG HỢP VẬT LIỆU LAI CẤU TRÚC NANO HAI CHIỀU GIỮA POLYME ĐỒNG TRÙNG HỢP POLYPYRROL-POLYPYRROL CARBOXYL (PPY-PPA) VÀ OXÍT GRAPHEN DẠNG KHỬ ĐIỆN HÓA (ERGO) ỨNG DỤNG CHẾ TẠO CẢM BIẾN TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH SỚM

(57) Sáng chế đề xuất quy trình chế tạo vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp polypyrrol-polypyrrol carboxyl (Ppy-PPa) và oxít graphen dạng khử điện hóa (erGO) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong chẩn đoán sớm bệnh. Theo quy trình này, kháng thể đơn dòng được cố định lên điện cực PPy-PPa/erGO/SPCE (Screen-Printed Carbon ink Electrode - điện cực mực in các bon) thông qua liên kết hóa trị giữa nhóm amin của kháng thể với nhóm carboxyl của màng polyme. Các nhóm chức hydroxyl (-OH) ở trên bề mặt và nhóm methyl (-CH₃) đính ở rìa các đơn lớp erGO đóng vai trò là các đích oxy hóa trong phản ứng trùng hợp polyme PPy-PPa dẫn đến chuỗi PPy-PPa liên kết với erGO phát triển thành cấu trúc tấm nano hai chiều. PPy-PPa gắn chặt trên erGO thông qua tương tác xếp chồng $\pi - \pi$, giãn nở và co rút do sự kích thích hoặc phi kích thích được cung cấp bởi mạng lưới các tấm erGO mang lại sự phát triển ổn định của màng polyme PPy-PPa làm tăng độ lặp lại của cảm biến. Hơn nữa, erGO tạo ra một mạng dẫn điện ở dưới lớp polyme PPy-PPa, tạo điều kiện vận chuyển điện tử giữa PPy-PPa và erGO sẽ làm tăng độ nhạy của cảm biến.



Lĩnh vực kỹ thuật đề cập

Sáng chế đề cập đến công nghệ tổng hợp vật liệu lai có cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp polypyrrol (PPy)-polypyrrol cacboxyl (PPa) và oxít graphen dạng khử điện hóa (electrochemical reduced graphene oxide - erGO) ứng dụng trong chế tạo cảm biến miễn dịch xác định chỉ dấu sinh học kháng nguyên AFP (Alphafetoprotein) chẩn đoán sớm ung thư gan. Vật liệu lai được tổng hợp trên điện cực mực in các bon SPCE (screen-printed carbon ink electrode) theo phương pháp điện hóa quét thể tuần hoàn. Sáng chế cũng cung cấp phương pháp khử điện hóa tẩm oxít graphen (GO) thành graphen dạng erGO (electrochemical reduced graphene oxide) có tính dẫn điện cao. Phương pháp này có ưu điểm đơn giản, nhanh, không gây ô nhiễm môi trường và sản phẩm erGO không bị nhiễm bẩn do trong quá trình khử không dùng bất kỳ tác nhân hóa học khử nào. Đồng thời điện cực được biến tính với erGO có thể được sử dụng làm chất xúc tác điện hóa hoặc ứng dụng trong chế tạo cảm biến sinh học do có diện tích bề mặt riêng lớn và tính tương thích sinh học cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một trong những yếu tố quan trọng quyết định tới chất lượng của cảm biến sinh học chính là phương pháp cố định các đầu thu sinh học (enzym, kháng thể, DNA...) lên trên bề mặt điện cực cảm biến. Phương pháp cố định không những phải đảm bảo tính gắn kết về mặt cơ học mà còn phải đảm bảo liên kết về mặt tín hiệu giữa đầu thu sinh học với bộ phận chuyển đổi của cảm biến, duy trì được hoạt tính cũng như tính ổn định sinh học và kiểm soát được sự phân bố định hướng của đầu thu sinh học trên bề mặt điện cực rắn. Cho đến nay đã có nhiều phương pháp cố định được phát triển, trong số đó có phương pháp sử dụng liên kết cộng hóa trị giữa màng polyme phủ trên bề mặt điện cực cảm biến với đầu thu sinh học. Phương pháp này cải thiện được hình thái, mật độ, sự phân bố của các đầu thu sinh học cũng như tái tạo lại và đồng nhất bề

mặt điện cực cảm biến. Phương pháp cố định này có thể làm giảm hoặc loại bỏ một số vấn đề như sự không ổn định, khuếch tán, kết tủa, hoặc khử hoạt tính của phân tử sinh học của một số phương pháp cố định khác như hấp thụ vật lý, bẫy hay hóa rắn. Một số nghiên cứu đã đề cập đến việc sử dụng màng polyme PPy để cố định enzym, DNA, kháng thể... Tuy nhiên, số lượng nhóm -NH xuất hiện trên màng không nhiều, dẫn đến hiệu suất cố định không cao. Hơn nữa, bản chất của PPy là polyme dẫn có tính kỵ nước trong khi đó PPA có độ dẫn kém hơn nhưng có tính ưa nước. Như vậy, polyme đồng trùng hợp PPy-PPa có thể lợi dụng được đặc tính cao về độ dẫn và tính tương thích sinh học của PPy, tính ưa nước và khả năng tạo liên kết hóa trị giữa gốc -COOH của PPA với nhóm amin (-NH₂) của kháng thể làm tăng hiệu suất cố định dẫn đến tăng độ nhạy của cảm biến. Bên cạnh đó, hiệu suất cố định cũng phụ thuộc mạnh vào diện tích bề mặt riêng của điện cực cảm biến.

Graphen, một dạng thù hình của các bon với cấu trúc phẳng 2D, có cấu tạo là một đơn lớp các bon tinh khiết, liên kết với nhau thành một mạng lưới lục giác hình tổ ong bằng liên kết sp². Chính vì cấu trúc này nên graphen rất bền vững, trơ về mặt hóa học và có diện tích bề mặt riêng rất lớn (2630 m²/g đối với graphen đơn lớp, gấp 2 lần so với ống nano các bon đơn vách). Trong cấu trúc của graphen, ngoài liên kết sigma (σ) bền vững còn tồn tại liên kết pi (π) kém bền hơn và có định hướng không gian vuông góc với các orbital sp² nên các điện tử tham gia liên kết này rất linh động dẫn tới graphen có độ dẫn điện rất cao và được kỳ vọng trở thành vật liệu “xương sống” trong phát triển linh kiện điện tử thế hệ mới. Trong số các phương pháp tổng hợp vật liệu graphen thì phương pháp tách lớp hóa học từ graphit qua hai giai đoạn oxy hóa tách lớp graphit từ oxít graphen (GO) và khử hóa GO thành graphen có thể tạo ra được lượng sản phẩm lớn với chi phí thấp và chất lượng vừa đủ để ứng dụng. Vật liệu tạo thành sau bước khử điện hóa GO được gọi là erGO có độ dẫn được cải thiện hơn so với GO, diện tích riêng bề mặt đạt 560,6 m²/g và có cấu trúc nano xốp. Hơn nữa, erGO chứa các nhóm chức như nhóm hydroxyl (-OH) và epoxy (-O) ở trên bề mặt và nhóm metyl (-CH₃) đính ở rìa các đơn lớp. Các nhóm chức này hoàn toàn có thể tham gia vào phản ứng trùng hợp để tổng hợp polyme.

Cho đến nay, chưa có công bố nào về nghiên cứu tổng hợp màng polyme đồng

trùng hợp PPy-PPa trên điện cực thương mại in lưới màng dày với mực in các bon (SPCE) được biến tính bởi erGO ứng dụng trong chế tạo cảm biến miễn dịch điện hóa chẩn đoán sớm ung thư gan. Các kỹ thuật sử dụng trong sáng chế cho phép thực hiện trên các thiết bị đơn giản, chi phí thấp và phù hợp điều kiện khoa học công nghệ của Việt Nam. Sáng chế có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất tổ hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp và oxit graphen dạng khử điện hóa (PPy-PPa/erGO) có thể được sản xuất và tích hợp dễ dàng vào các thiết bị có liên quan.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình chế tạo vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong chẩn đoán bệnh sớm. Theo quy trình này, đầu tiên điện cực SPCE được biến tính bởi lớp GO bằng phương pháp nhỏ phủ. Sau đó GO được khử điện hóa thành erGO trên bề mặt điện cực cảm biến tại điện áp -1,5 V so với điện cực Ag/AgCl giúp cải thiện độ dẫn cũng như làm tăng diện tích bề mặt riêng của điện cực. Các nhóm chức hydroxyl (-OH) ở trên bề mặt và nhóm methyl (-CH₃) đính ở rìa các đơn lớp đóng vai trò là các đích oxy hóa trong phản ứng trùng hợp polyme PPy-PPa dẫn đến chuỗi PPy-PPa liên kết với erGO phát triển thành cấu trúc tấm nano hai chiều chứ không phải là dạng bông súp lơ thông thường (cauliflower). Lớp màng erGO tạo ra một mạng dẫn điện ở dưới lớp polyme PPy-PPa, tạo điều kiện vận chuyển điện tử giữa PPy-PPa và erGO dẫn đến làm tăng độ nhạy của cảm biến. Hơn nữa, PPy-PPa gắn chặt trên erGO thông qua tương tác xếp chồng π - π , giãn nở và co rút do sự kích thích hoặc phi kích thích được cung cấp bởi mạng lưới các tấm erGO, mang lại sự phát triển ổn định của màng polyme PPy-PPa làm tăng độ lặp lại của cảm biến. Trái với công nghệ hiện tại, màng polyme thường được tổng hợp trực tiếp trên điện cực cảm biến nên cấu trúc polyme thường có dạng bông súp lơ và dễ xảy ra hiệu ứng tách màng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình công nghệ chế tạo tổ hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO sử dụng phương pháp nhỏ phủ và điện hóa quét thể tuần hoàn theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất việc ứng dụng vật liệu lai theo sáng chế để chế tạo cảm biến miễn dịch điện hóa phổ tổng trở faradaic (EIS) và quét thế tuần hoàn (CV) dùng trong chẩn đoán sớm bệnh. Cảm biến này hoạt động theo nguyên tắc khi xảy ra phản ứng miễn dịch đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể được cố định trên bề mặt điện cực của cảm biến sẽ hình thành nên một lớp màng điện môi làm ngăn cản quá trình truyền điện tích trong dung dịch đo tới điện cực. Dẫn tới làm tăng giá trị điện trở truyền điện tích (R_{CT}) trong mạch tương đương Randles đồng thời làm giảm cường độ dòng tín hiệu của hệ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình cố định kháng thể lên bề mặt điện cực cảm biến thông qua nhóm $-COOH$ của màng vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phân tích hỗ trợ các tính chất của điện cực cảm biến sau mỗi bước công nghệ bằng phương pháp đo quang phổ Raman và chụp ảnh hiển vi điện tử quét SEM.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình xác định kháng nguyên AFP bằng cảm biến miễn dịch điện hóa phổ tổng trở faradaic và quét thế tuần hoàn (CV) sử dụng vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO theo sáng chế. Quy trình này gồm các công đoạn chính là: xây dựng đường chuẩn của cảm biến; xác định giới hạn phát hiện của cảm biến; và sử dụng cảm biến để phân tích mẫu trong thực tế với sai số đo xác định.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được minh họa rõ hơn thông qua các hình vẽ kèm theo dưới đây, trong đó:

Hình 1: Quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp PPy-PPa và erGO trên điện cực SPCE bằng phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn (CV) ứng dụng cố định kháng thể.

Hình 2: Nguyên lý hoạt động của cảm biến điện hóa phổ tổng trở faradaic.

Hình 3: Quy trình xử lý mẫu máu bệnh phẩm.

Hình 4: Đáp ứng dòng - thế của điện cực được tổng hợp màng polypyrrol – polypyrrol carboxyl (PPy-PPa) với tỷ lệ 2-pyrrol-carboxyl axit (Pa) so với monome

pyrrol (Py) thay đổi từ 0 đến 100% mol trong dung dịch bao gồm $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5mM và KCl 0,1 M với tốc độ quét là 50 mV/s.

Hình 5: Đặc trưng quang phổ Raman của màng polyme đồng trùng hợp PPy-PPa trên điện cực SPCE (đo tại 4 vị trí khác nhau) tại bước sóng kích thích là 633 nm trong 30 giây với công suất 25 mW và độ phân giải nhỏ hơn 2 cm^{-1} .

Hình 6: Bảng 1: số sóng đặc trưng trong phổ Raman của polyme đồng trùng hợp PPy-PPa theo thực nghiệm và so sánh với giá trị lý thuyết.

Hình 7: Đáp ứng a) phổ EIS trong khoảng tần số từ 50 mHz đến 100 kHz tại thế hở mạch OCP, điện áp xoay chiều 10 mV và b) đặc trưng dòng-thế tại tốc độ quét 50 mV/s của cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng polyme đồng trùng hợp PPy-PPa (với tỷ lệ Pa so với Py là 3:1) với nồng độ kháng nguyên AFP thay đổi từ 0 đến 100 ng.mL⁻¹. Dung dịch đo gồm $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mM và KCl 0,1 M. Đường đặc trưng chuẩn của cảm biến c) đo EIS thể hiện sự phụ thuộc của giá trị ΔR_{CT} và d) cảm biến đo CV thể hiện sự phụ thuộc của sự thay đổi cường độ dòng píc khử ΔI_{pc} vào nồng độ kháng nguyên AFP.

Hình 8: A) Đường quét CV khử GO trên bề mặt điện cực SPCE thành erGO trong dung dịch PBS 100 mM (pH = 6,6), 30 vòng tại tốc độ 50 mV/s. B) Đặc trưng quang phổ Raman của màng GO và màng erGO trên điện cực SPCE tại bước sóng kích thích là 633 nm trong 30 giây với công suất 25 mW và độ phân giải nhỏ hơn 2 cm^{-1} .

Hình 9: Ảnh chụp hiển vi điện tử quét (SEM) của a) bề mặt điện cực SPCE trần, b) có nhỏ phủ GO, c) điện cực SPCE biến tính bởi erGO và d) điện cực được tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa PPy-PPa và erGO.

Hình 10: Đáp ứng a) phổ EIS trong khoảng tần số từ 50 mHz đến 100 kHz tại thế hở mạch OCP, điện áp xoay chiều 10 mV và b) dòng-thế (CV) tại tốc độ quét 50 mV/s của cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng tổ hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO với nồng độ kháng nguyên AFP thay đổi từ 0 đến 100 ng.mL⁻¹. Dung dịch đo gồm $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mM và KCl 0,1 M. Đường đặc trưng chuẩn của c) cảm biến đo EIS thể hiện sự phụ thuộc của giá trị ΔR_{CT} và d) cảm biến đo CV thể

hiện sự phụ thuộc của sự thay đổi cường độ dòng pic khử ΔI_{pc} vào nồng độ kháng nguyên AFP.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết có dựa vào các hình vẽ kèm theo. Phần mô tả sau đây nhằm mục đích giúp hiểu rõ hơn sáng chế thông qua việc mô tả một số khía cạnh và các phương án thực hiện. Các khía cạnh và các phương án này không có mục đích giới hạn sáng chế chỉ như vậy.

Sau đây, các khía cạnh của sáng chế theo các phương án ưu tiên thực hiện sẽ được mô tả.

Trước hết là về quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp PPy-PPa và erGO ứng dụng cố định kháng thể. Theo một phương án ưu tiên quy trình này bao gồm các bước sau:

Bước 1: *Nhỏ phủ GO*

Phân tán GO trong nước đề ion với nồng độ $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nhỏ 3 μL dung dịch này lên điện cực của cảm biến và để khô ở điều kiện nhiệt độ phòng. Lặp lại bước này khoảng 5 lần thu được điện cực SPCE có lớp GO phủ trên bề mặt (ký hiệu là GO/SPCE).

Bước 2: *Khử điện hóa GO trên SPCE tạo erGO*

Nhỏ 35 μL dung dịch PBS 100 mM (pH = 6,6) lên điện cực GO/SPCE và tiến hành quét thế phân cực vòng CV từ 0 đến -1,5 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl với số vòng quét là 10, 20 và 30, tốc độ quét là 50 mV/s. Dưới tác dụng của điện áp trong môi trường dung dịch PBS, các nhóm chức chứa oxy như epoxy, carboxyl và hydroxyl trên bề mặt của GO sẽ bị khử và giữ lại mạng của graphen. Qua bước này thu được điện cực erGO/SPCE.

Bước 3: *Tổng hợp polyme đồng trùng hợp PPy-PPa trên điện cực erGO/SPCE*

Monome Pa và Py được phân tán trong dung dịch PBS 10 mM (pH = 7,4) có chứa KCl 0,1 M. Tỷ lệ nồng độ mol Pa so với Py thay đổi từ 0 đến 100% mol. Nhúng ngập điện cực erGO/SPCE vào trong dung dịch polyme và quét thế vòng CV từ -0,8 V đến +0,8 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl, tốc độ quét 30 mV/s và 20 vòng quét.

Điện cực PPy-PPa/erGO/SPCE sau đó được rửa bằng nước đề ion, sấy nhẹ bằng dòng khí N₂ và sẵn sàng cho bước cố định kháng thể.

Bước 4: *Cố định kháng thể lên điện cực PPy-PPa/erGO/SPCE*

Đầu tiên tiến hành hoạt hóa nhóm -COOH của màng polyme PPy-PPa bằng hỗn hợp gồm N-hydroxysuccinimit (NHS) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimit (EDC). NHS và EDC được phân tán trong đệm PBS 10 mM. Sau đó trộn dung dịch NHS nồng độ 0,2 M và dung dịch EDC nồng độ 0,1 M theo tỷ lệ 1:1 và rung siêu âm nhanh trong vòng 15s. Sau đó lấy 3 μ L dung dịch này nhỏ lên bề mặt điện cực và ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút. Trong bước công nghệ này, EDC đã biến đổi nhóm carboxyl -COOH sang nhóm trung gian có khả năng phản ứng với nhóm amin của kháng thể tạo thành nhóm amit. Tuy nhiên, nhóm trung gian này rất dễ bị thủy phân trong dung môi nước. Do vậy, có thêm NHS sẽ làm cho nhóm trung gian tương tác với nhóm amin của NHS-este làm cho liên kết ổn định, tăng cường hiệu suất cố định kháng thể lên màng. Điện cực được rửa bằng dung dịch PBS 10 mM chứa 0,05 % Tween 20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate) và sau đó rửa lại bằng nước đề ion vài lần để loại bỏ hết các liên kết yếu cũng như các chất dư thừa sau phản ứng. Tiếp theo, nhỏ 3 μ L kháng thể có nồng độ từ 50 hoặc 100 μ g.mL⁻¹ lên bề mặt và ủ tại nhiệt độ phòng trong vòng 1 giờ. Lúc này, nhóm amin (-NH₂) của kháng thể sẽ tương tác với nhóm trung gian tạo thành nhóm amit bền vững. Điện cực được rửa bằng dung dịch PBS chứa 0,05% Tween 20 để loại bỏ hết các kháng thể liên kết yếu hoặc không liên kết với màng. Cuối cùng 3 μ L dung dịch etanolamin nồng độ 100 μ M được nhỏ lên bề mặt điện cực để ngăn chặn các liên kết không đặc hiệu với các gốc tự do dư thừa trên bề mặt, điện cực sẵn sàng cho các bước đo đạc tiếp theo.

Hình 1 trình bày quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp PPy-PPa và erGO trên điện cực SPCE bằng phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn CV.

Phần tiếp theo sẽ giải thích nguyên lý hoạt động của cảm biến miễn dịch điện hóa phổ tổng trở faradaic (EIS). Nguyên lý hoạt động cơ bản của cảm biến là khi phản ứng miễn dịch xảy ra giữa kháng nguyên (chất cần phân tích) và kháng thể (được cố

định trên bề mặt) sẽ hình thành nên một lớp màng điện môi làm tăng trở kháng của hệ điện hóa. Tín hiệu trở kháng được đo trong dung dịch gồm có 0,1 M KCl và 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ trong dải tần số từ 100 kHz đến 50 mHz tại thế hở mạch OCP và thế xoay chiều 10 mV. Hệ điện hóa được biểu diễn được bằng sơ đồ mạch điện tương đương Randles gồm các điện trở và tụ điện (hình 2). Các đại lượng này được xác định thông qua việc khớp phổ EIS. Trong đó, hai đại lượng R_S và Z_W đặc trưng cho các tính chất của dung dịch điện ly và sự khuếch tán của cặp chất dò $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Trong khi C_{dl} và R_{CT} phụ thuộc vào tính chất cách điện và dẫn điện tại bề mặt tiếp xúc giữa điện cực và chất điện phân tức là liên quan đến sự thay đổi trên bề mặt của điện cực. Vì vậy, chúng thường được lựa chọn làm tín hiệu phát hiện của cảm biến. Phổ EIS bao gồm một bán cung tại vùng tần số cao tương ứng với quá trình truyền điện tích diễn ra trên bề mặt điện cực làm việc và phần tuyến tính tại vùng tần số thấp liên quan tới quá trình khuếch tán của chất điện ly tới bề mặt điện cực. Giao điểm của phần bán cung với trục Z_{re} chính là giá trị của R_S và đường kính của bán cung chính là điện trở R_{CT} của mạch tương đương Randles. Như vậy, giá trị R_{CT} phụ thuộc vào nồng độ kháng nguyên tới liên kết đặc hiệu với kháng thể.

Tiếp theo, phép đo quang phổ Raman và chụp ảnh hiển vi điện tử quét SEM được thực hiện sau bước tổng hợp polyme đồng trùng hợp PPy-PPa cũng như khử điện hóa oxít graphen GO nhằm xác định sự có mặt của nhóm chức carboxyl -COOH có mặt trong màng polyme đồng trùng hợp, độ đồng nhất cũng như hình dạng của màng polyme được tổng hợp trên điện cực, và phân tích tính chất điện của GO sau quá trình khử điện hóa. Kỹ thuật đo quang phổ Raman dựa trên cơ sở tán xạ của chùm ánh sáng đơn sắc khi chiếu vào mẫu, tạo ra ánh sáng tán xạ Raman được ghi nhận lại bằng phần tử thu quang. Vạch phổ Raman cung cấp thông tin về dao động phân tử và cấu trúc tinh thể. Quang phổ Raman được sử dụng rộng rãi trong phân tích các hợp chất hữu cơ do mỗi nhóm chức hữu cơ có đặc trưng riêng về tần số hấp thụ. Dựa vào chiều cao đỉnh phổ Raman cho biết định lượng của nhóm chức hóa học trong mẫu phân tích. Với phương pháp chụp ảnh bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét SEM có thể tạo ra ảnh với độ phân giải cao của bề mặt mẫu vật bằng cách sử dụng một chùm điện tử (chùm các electron) hẹp quét trên bề mặt mẫu. Việc tạo ảnh của mẫu vật được

thực hiện thông qua việc ghi nhận và phân tích các bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu vật. Kính hiển vi điện tử quét có điểm mạnh là phân tích mà không cần phá hủy mẫu vật và có thể hoạt động ở chân không thấp. Như vậy, hai phương pháp kể trên sử dụng trong sáng chế được đề xuất như các phép phân tích hỗ trợ các tính chất của điện cực cảm biến sau mỗi bước công nghệ.

Tiếp theo, cảm biến miễn dịch điện hóa sẽ được ứng dụng thử nghiệm trong một quy trình phân tích mẫu. Cụ thể, quy trình phân tích mẫu bằng cảm biến miễn dịch điện hóa bao gồm các công đoạn sau.

Xây dựng đường chuẩn của cảm biến

Bước 1: Kháng nguyên được phân tán trong huyết thanh với nồng độ xác định.

Huyết thanh được lấy từ máu của 10 bệnh nhân âm tính với bệnh. Nhỏ 3 μL dung dịch kháng nguyên cần phân tích ở nồng độ xác định lên bề mặt điện cực cảm biến, ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút.

Bước 2: Rửa sạch bề mặt cảm biến bằng dung dịch PBS 10 mM, tiếp theo là nước và cuối cùng sấy nhẹ bằng dòng khí N_2 .

Bước 3: Nhỏ 35 μL dung dịch gồm có 0,1 M KCl và 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bao phủ toàn bộ 3 điện cực của cảm biến và tiến hành đo phổ EIS.

Bước 4: Biểu diễn phổ EIS trên mặt phẳng Nyquist.

Bước 5: Dùng phần mềm Ivium khớp phổ tổng trở bằng mạch tương đương Randles, xác định giá trị các phần tử điện trong mạch.

Lặp lại bước 1 đến bước 5 với các mẫu phân tích với nồng độ xác định khác.

Bước 6: Xây dựng đồ thị phụ thuộc của giá trị R_{CT} vào nồng độ chất phân tích. Đồ thị nhận được là đường chuẩn của cảm biến phát hiện lượng chất cần phát hiện có trong mẫu phân tích.

Xác định giới hạn phát hiện của cảm biến

Bước 1: Đo phổ EIS của điện cực chỉ có kháng thể cố định trên bề mặt. Mẫu đo này được gọi là mẫu trắng (blank).

Bước 2: Tiến hành chế tạo và đo 5 mẫu trắng như bước 1. Xác định độ lệch chuẩn của 5 mẫu trắng.

Bước 3: Xác định độ dốc của đường chuẩn của cảm biến.

Bước 4: Giới hạn phát hiện của cảm biến được xác định theo công thức: 3 lần độ lệch chuẩn chia cho độ dốc (slope) của đường chuẩn.

Xác định nồng độ chất phân tích có trong mẫu thực

Trên hình 3 trình bày sơ đồ quy trình xử lý mẫu thực. Sau khi xử lý xong, lấy 2 μL dung dịch nhỏ lên điện cực và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rửa điện cực bằng đệm PBS 10 mM và nước rồi sấy nhẹ bằng dòng khí N_2 . Nhỏ 35 μL dung dịch gồm có 0,1 M KCl và 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bao phủ toàn bộ 3 điện cực của cảm biến và tiến hành đo phổ EIS. Biểu diễn phổ EIS trên mặt phẳng Nyquist. Dùng phần mềm Ivium khớp phổ tổng trở bằng mạch tương đương Randles, xác định giá R_{CT} . Chiều giá trị này lên đường chuẩn của cảm biến để xác định nồng độ chất phân tích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

- a) Sử dụng phương pháp quét thế CV xác định tỷ số hợp phần tối ưu giữa Pa và Py
 - Thực hiện bước 3 của quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO như mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”. Tỷ lệ mol hợp phần của Pa với Py bao gồm 0 mM:160 mM; 40 mM:120 mM; 80 mM:80 mM; 120 mM:40 mM; 1600 mM:0 mM
 - Đường quét CV của điện cực đã được tổng hợp màng PPy-PPa với các tỷ lệ mol hợp phần Pa/Py khác nhau được thực hiện trong dung dịch oxy hóa - khử gồm có 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ phân tán trong 0,1 M KCl và tại tốc độ quét là 50 mV/s. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ được chọn để khảo sát là do hệ này dạng oxy hóa (Fe^{3+}) và dạng khử (Fe^{2+}) đều hòa tan tốt và ổn định trong dung dịch, xảy ra với tốc độ nhanh nên có tính thuận nghịch cao. Cường độ píc oxy hóa hoặc píc khử trên đường đặc trưng dòng - thế cho biết độ dẫn của màng. Trên hình 4 trình bày đường quét CV của các màng PPy-PPa với tỷ lệ hợp phần khác nhau được tổng hợp thành công trên điện cực SPCE. Kết quả cho thấy các màng PPy-PPa đều cho đáp ứng điện hóa tốt trong dung dịch đo. Tuy nhiên, cường độ dòng píc oxy hóa và khử của chúng rất khác nhau và phụ thuộc vào tỷ lệ hợp phần của Pa so với Py. Đối với cả hai trường hợp màng

PPy thuần (số mol Pa là 0) và PPa thuần (số mol Py là 0) đều có đáp ứng điện hóa thấp nhất. Khi tỷ lệ mol Pa so với Py tăng lên thì cường độ dòng píc oxy hóa và khử đều giảm. Điều này dễ dàng giải thích được là do độ dẫn của Pa thấp hơn so với Py. Tại tỷ lệ hợp phần của Pa với Py là 1:3 (40 mM:120 mM) cho màng có độ dẫn cao nhất và đáp ứng điện hóa tốt nhất với hai píc oxy hóa và khử rất rõ ràng tại điện áp lần lượt là +0,26 V và -0,06 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl. Điều này có thể giải thích được là do sự có mặt của Pa đã làm tăng tính thấm ướt bề mặt, giảm tính kỵ nước của Py và sự có mặt của Py cải thiện độ dẫn của Pa. Tỷ lệ này được dự tính như một trong các phương án ưu tiên.

- Phép đo quang phổ Raman được thực hiện sau bước tổng hợp màng PPy-PPa tại bước sóng kích thích là 633 nm trong 30 giây với công suất 25 mW và độ phân giải nhỏ hơn 2 cm^{-1} . Đặc trưng phổ Raman của màng polyme đồng trùng hợp PPy-PPa tại tỷ lệ hợp phần tối ưu của Pa so với Py (1:3) được trình bày trên hình 5 tại các số sóng đặc trưng được liệt kê chi tiết trong hình 6. Kết quả quang phổ Raman cho thấy màng PPy-PPa tồn tại cả gốc cation và dication trong đó bậc liên kết của $C_3 C_4$ và $C C$ xen kẽ được tăng lên so với polyme thuần PPy. Sự biến dạng cấu trúc trong dication lớn hơn so với gốc cation. Hơn nữa, sự xuất hiện của vạch phổ Raman tại số sóng 1398 đến 1400 cm^{-1} khẳng định sự có mặt của nhóm carboxyl trong cấu trúc màng. Vạch phổ tại số sóng lân cận 1400 cm^{-1} luôn luôn tìm thấy trong các chất có chứa nhóm carboxyl bị ion hóa và được giả thiết là tương ứng với dao động hóa trị đối xứng của nhóm COO^- . Trên hình 5 cũng cho thấy đặc trưng quang phổ Raman của màng PPy-PPa tại 4 vị trí khác nhau trên điện cực đều cho kết quả tương tự nhau. Điều này chứng tỏ màng được tạo thành có tính đồng nhất cao.

b) Cảm biến miễn dịch điện hóa PPy-PPa/SPCE xác định kháng nguyên AFP

- Thực hiện bước 4 trong quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp PPy-PPa và erGO ứng dụng cố định kháng thể đơn dòng Mab AFP trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”. Mab AFP được cố định lên màng PPy-PPa thông qua liên kết hóa trị giữa nhóm amin $-\text{NH}_2$ của

kháng thể với nhóm carboxyl $-COOH$ của màng. Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody – mAb) là kháng thể được tạo thành từ những tế bào lympho B có nguồn gốc từ một dòng tế bào lympho B và được sản xuất theo kỹ thuật tế bào lai hybridoma. Với kỹ thuật này, việc sản xuất mAb yêu cầu phải tiến hành gây kích ứng miễn dịch cho động vật, thường là một con chuột, sau đó thu nhận các tế bào sản xuất kháng thể từ lách của nó và dung hợp các tế bào này với tế bào ung thư để làm cho chúng trở nên bất tử giống như đặc điểm của các tế bào ung thư, điều này có nghĩa là chúng sẽ phát triển và phân chia vô hạn định. Một khối các tế bào hợp nhất được gọi là khối tế bào lai hybridoma, và các tế bào này sản xuất ra mAb. Do vậy, kháng thể đơn dòng chỉ nhận biết duy nhất một epitope trên một kháng nguyên cho sẵn nên có độ đặc hiệu rất cao.

- Trên hình 7a trình bày đặc trưng phổ tổng trở EIS biểu diễn trên mặt phẳng Nyquist của cảm biến Mab AFP/PPy-PPa/SPCE. Kết quả cho thấy đường kính bán cung trong mặt phẳng Nyquist (tương đương với giá trị R_{CT}) tăng tương ứng với nồng độ kháng nguyên AFP tăng. Sự tăng này được giải thích là do xảy ra phản ứng kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể tạo ra một lớp điện môi mỏng ngăn cản quá trình truyền điện tử đến điện cực. Tiến hành khớp phổ EIS sử dụng mạch tương đương Randles xác định được R_{CT} ứng với mỗi nồng độ kháng nguyên. Xây dựng đường đặc trưng chuẩn của cảm biến thể hiện sự phụ thuộc của ΔR_{CT} (sự thay đổi giá trị R_{CT} của cảm biến tại nồng độ kháng nguyên xác định so với mẫu trắng) vào nồng độ kháng nguyên AFP. Trên hình 7b trình bày đường đặc trưng của cảm biến. Tiến hành khớp tuyến tính đường đặc trưng chuẩn xác định được giới hạn phát hiện (LOD) của cảm biến là $2,46 \text{ ng.mL}^{-1}$ trong dải nồng độ từ 1 đến 80 ng.mL^{-1} (với $R^2 = 0,984$).
- Trên hình 7c) trình bày đường quét thế tuần hoàn (CV) của cảm biến Mab AFP/PPy-PPa/SPCE. Phương pháp CV còn gọi là phương pháp von-ampe vòng quét xung tam giác là phương pháp điện hóa được sử dụng để nghiên cứu tính chất điện hóa cũng như động học và cơ chế phản ứng của chất nghiên cứu trên các điện cực khác nhau. Phương pháp CV cho phép áp đặt lên điện

cực nghiên cứu điện thế có giá trị xác định, được quét theo hướng anốt hay catốt để quan sát dòng tương ứng. Khoảng thế nghiên cứu phụ thuộc việc lựa chọn dung môi và chất điện li nền. Đối với $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ và điện cực in lưới mực in các bon nên khoảng thế được quét từ -0,4 đến + 0,6 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl và sử dụng một chu kỳ quét. Để tránh sự khuấy trộn đối lưu của lớp khuếch tán, tốc độ quét được lựa chọn là 50 mV/s. Kết quả cho thấy trên đường phân cực vòng CV xuất hiện hai đỉnh đặc trưng I_{pa} (anốt) và I_{pc} (catốt) có cường độ dòng cực đại. Khi nồng độ kháng nguyên tăng cường độ dòng I_{pa} và I_{pc} đều giảm. Điều này chứng tỏ trên bề mặt điện cực cảm biến đã xảy ra tương tác liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, dẫn tới hình thành lớp điện môi ngăn cản quá trình truyền điện tích. Lập đường chuẩn xác định nồng độ kháng nguyên của cảm biến bằng phương pháp CV. Trên hình 7d) trình bày sự phụ thuộc của ΔI_{pc} (sự thay đổi của I_{pc} tại từng nồng độ kháng nguyên so với mẫu trắng) vào nồng độ kháng nguyên C cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính theo phương trình $\Delta I_{pc}(\mu A) = 0,16 * C (ng / mL) + 0,37$ ($R^2 = 0,998$) trong dải nồng độ từ 0 đến 80 ng.mL⁻¹.

c) Khử điện hóa GO tạo erGO trên SPCE

- Thực hiện bước 1 và 2 của quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO như được mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”. Nhỏ 35 μ L dung dịch PBS nồng độ 100 mM có độ pH là 6,6 lên điện cực GO/SPCE, quét thế tuần hoàn từ 0 đến -1,5 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl với số vòng quét lần lượt là 10, 20 và 30 tại tốc độ quét là 50 mV/s. Dưới tác dụng của điện áp trong môi trường PBS, các nhóm chức chứa oxy như epoxy, carboxyl và hydroxyl trên bề mặt của GO sẽ bị khử và giữ lại mạng của graphen. Trên hình 8A) trình bày đáp ứng dòng theo thế quét tuần hoàn của quá trình khử GO thành erGO trên bề mặt điện cực SPCE. Tại đường quét CV đầu tiên xuất hiện pic khử (catot) tại điện áp -1,25 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl có thể được giải thích là do xảy ra quá trình khử các nhóm chức chứa oxy có trên bề mặt. Trên đường quét CV thứ hai, cường độ dòng pic khử giảm mạnh và gần

như biến mất hoàn toàn sau vài đường quét CV tiếp theo. Điều này chứng tỏ đã khử được các nhóm chức chứa oxy trên bề mặt GO và “khung” sp² của tấm graphen được tái hiện trở lại. Tuy nhiên, số lượng của các nhóm chức chứa oxy trên bề mặt GO bị khử tùy thuộc vào lượng chất khử được sử dụng. Các tác nhân khử đều phản ứng 1:1 với các nhóm COH, C=O hoặc COOH của GO và khử chúng trở lại -CH₃ hoặc C-OH hoặc C=O trong erGO. Để đánh giá chất lượng của các tấm erGO sau quá trình khử điện hóa, các tác giả tiến hành phép đo quang phổ Raman trên các tấm GO và erGO. Phép đo quang phổ Raman thường được sử dụng để nghiên cứu tính chất của các sản phẩm của các bon do trong các sản phẩm này tín hiệu Raman được tăng cường bởi các liên kết các bon và các bon liên hợp. Trên đặc trưng quang phổ Raman của sản phẩm các bon thường xuất hiện hai vạch phổ G band (tại số sóng 1350 cm⁻¹) và vạch D band (tại số sóng 1585 cm⁻¹) tương ứng lần lượt với tán xạ bậc 1 của phonon E_{g2} của nguyên tử các bon sp² và một thở (breathing mode) của các phonon điểm k của các sai hỏng cấu trúc đối xứng A_{1g} gây ra bởi các liên kết epoxy và hydroxyl. Kết quả đo quang phổ Raman (hình 8B) cho thấy các tấm erGO thu được sau quá trình khử điện hóa với các số vòng quét CV khác nhau đều có cường độ D band và G band giảm mạnh và chân pic được mở rộng hơn so với GO. Hơn nữa, kết quả Raman cũng cho thấy mức độ giảm cường độ phụ thuộc mạnh vào số vòng quét CV trong quá trình khử điện hóa. Khi so sánh tỷ số cường độ G band với D band (I_G/I_D với I_G và I_D được xác định bằng phần diện tích của pic G và D band tương ứng) với độ dẫn điện thì thấy tỷ số này càng nhỏ thì độ dẫn điện càng cao. Tỷ số I_G/I_D của erGO ứng với số vòng quét CV 10, 20 và 30 tương ứng lần lượt là 0,46; 0,39 và 0,34. Trong khi đó tỷ số này của GO là 0,71 cao gấp đôi so với erGO. Tỷ số này khá cách biệt giữa 10 và 20 vòng quét CV nhưng cách biệt rất ít tại vòng quét 20 và 30. Như vậy, màng erGO với 30 vòng quét CV cho độ dẫn cao nhất và được lựa chọn làm thông số tối ưu khi khử điện hóa GO. Hơn nữa, số vòng quét CV lớn hơn 30 không được khảo sát và sử dụng do đặc điểm của cảm biến in lưới tích hợp đồng thời với điện cực chuẩn mực in Ag/AgCl và điện cực so sánh mực in các bon. Với

số vòng quét lớn, thời gian quét lớn có thể phá hỏng điện cực chuẩn Ag/AgCl gây khó khăn cho việc sử dụng điện cực cho các bước phân tích tiếp theo.

- Trên hình 9b và 9c lần lượt trình bày ảnh chụp hiển vi điện tử quét (SEM) của bề mặt điện cực SPCE (hình 9a) được nhỏ phủ GO và erGO thu được sau khử điện hóa GO. Kết quả cho thấy có sự khác biệt về hình thái học bề mặt của GO và erGO. Trên bề mặt erGO xuất hiện nhiều nếp gấp hơn và bề mặt cuộn vào nhau, đây chính là dấu hiệu đặc trưng cho thấy các lớp graphene đã tách ra khỏi mạng lưới tinh thể của graphite. Hơn nữa, các nếp gấp này rất có lợi cho việc duy trì diện tích bề mặt riêng của điện cực cao khi mà tấm erGO không dễ dàng bị sụp xuống trở về cấu trúc graphite.

d) Tổng hợp màng PPy-PPa trên erGO/SPCE

- Thực hiện bước 3 của quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO như mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”. Chọn tỷ lệ mol của Pa so với Py là 1:3 (40 mM Pa và 120 mM Py). Trên hình 9d trình bày ảnh SEM của màng PPy-PPa trên điện cực erGO/SPCE. Kết quả cho thấy màng PPy-PPa hình thành trên erGO có hình thái bề mặt hoàn toàn khác lạ so với dạng thông thường của chúng (dạng bông súp lơ, dạng sợi hoặc dạng hạt). Trên bề mặt màng có rất nhiều nếp nhăn, chúng uốn cong vào trong và ra ngoài tựa như cấu trúc vỏ não người. Những nếp nhăn này làm tăng diện tích riêng bề mặt màng lên rất nhiều và làm giảm khoảng cách giữa các chuỗi polyme, do đó làm tăng khả năng truyền dẫn điện tử trong màng giúp xử lý tín hiệu cảm biến rất nhanh. Sự hình thành dạng hình thái bề mặt này của màng hoàn toàn có thể giải thích được là do hai nguyên nhân sau: i) các nhóm chức hydroxyl (-OH) ở trên bề mặt và nhóm metyl (-CH₃) đính ở rìa các đơn lớp đóng vai trò là các đích oxy hóa trong phản ứng trùng hợp polyme PPy-PPa dẫn đến chuỗi PPy-PPa liên kết với erGO phát triển thành cấu trúc tấm nano hai chiều chứ không phải là dạng bông súp lơ hoặc dạng hạt thông thường; ii) PPy-PPa gắn chặt trên erGO thông qua tương tác xếp chồng π - π , giãn nở và co rút do sự kích thích hoặc phi kích thích được cung cấp bởi mạng lưới các tấm erGO dẫn đến hình thành các nếp nhăn uốn cong vào trong và ra ngoài. Chính

cấu trúc này mang lại sự phát triển ổn định của màng polyme PPy-PPa qua đó làm tăng độ lặp lại của cảm biến. Hơn nữa, erGO tạo ra một mạng dẫn điện ở dưới lớp polyme PPy-PPa, tạo điều kiện cho quá trình vận chuyển điện tử giữa PPy-PPa và erGO làm tăng độ nhạy của cảm biến.

- Vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa PPy-PPa và erGO theo sáng chế được chế tạo bằng phương pháp điện hóa đơn giản nhưng mang lại hiệu quả cao khi ứng dụng trong cảm biến sinh học (giúp tăng cường độ nhạy và độ lặp lại của cảm biến).

e) Cảm biến miễn dịch điện hóa PPy-PPa/erGO/SPCE xác định kháng nguyên AFP

- Thực hiện các bước từ 1 đến 4 của quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều PPy-PPa/erGO như được mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”.
- Trên hình 10a và 10b lần lượt trình bày đặc trưng phổ tổng trở EIS biểu diễn trên mặt phẳng Nyquist và đường chuẩn của cảm biến sử dụng vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều Mab AFP/PPy-PPa/erGO/SPCE. Kết quả cho thấy đường kính bán cung trong mặt phẳng Nyquist (tương đương với giá trị R_{CT}) tăng tương ứng với việc tăng nồng độ kháng nguyên AFP và tăng mạnh hơn so với tín hiệu cảm biến sử dụng màng polyme đồng trùng hợp PPy-PPa (khoảng hai bậc). Hơn nữa, R_{CT} của mẫu trắng cũng chỉ khoảng 289 Ω , nhỏ hơn nhiều so với mẫu trắng của cảm biến sử dụng PPy-PPa (891 Ω). Điều này chứng tỏ, việc sử dụng vật liệu lai đã cải thiện được độ dẫn của màng polyme PPy-PPa. Thêm nữa, cảm biến hoàn toàn phát hiện được ngay tại nồng độ kháng nguyên thấp 0,1 ng.mL⁻¹. Trên hình 10b trình bày đường đặc trưng của cảm biến sử dụng vật liệu lai. Tiến hành khớp tuyến tính đường đặc trưng chuẩn xác định được LOD của cảm biến là 0,34 ng.mL⁻¹ trong dải nồng độ từ 0,1 đến 100 ng.mL⁻¹ với độ tuyến tính cao ($R^2 = 0,997$) và độ nhạy đạt 57 Ω /ng.mL⁻¹ lớn hơn so với cảm biến sử dụng polyme PPy-PPa (31 Ω /ng.mL⁻¹).
- Trên các hình 10c và 10d lần lượt trình bày đường quét thế tuần hoàn (CV) và đường đặc trưng chuẩn của cảm biến sử dụng vật liệu lai. Kết quả cho thấy, tín hiệu dòng cảm biến giảm khi nồng độ kháng nguyên tăng. So với cảm biến sử dụng PPy-PPa, tín hiệu dòng thay đổi mạnh hơn khi sử dụng vật liệu lai. Điều

này một lần nữa chúng tỏ độ dẫn của PPy-PPa được cải thiện khi kết hợp cùng với erGO.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

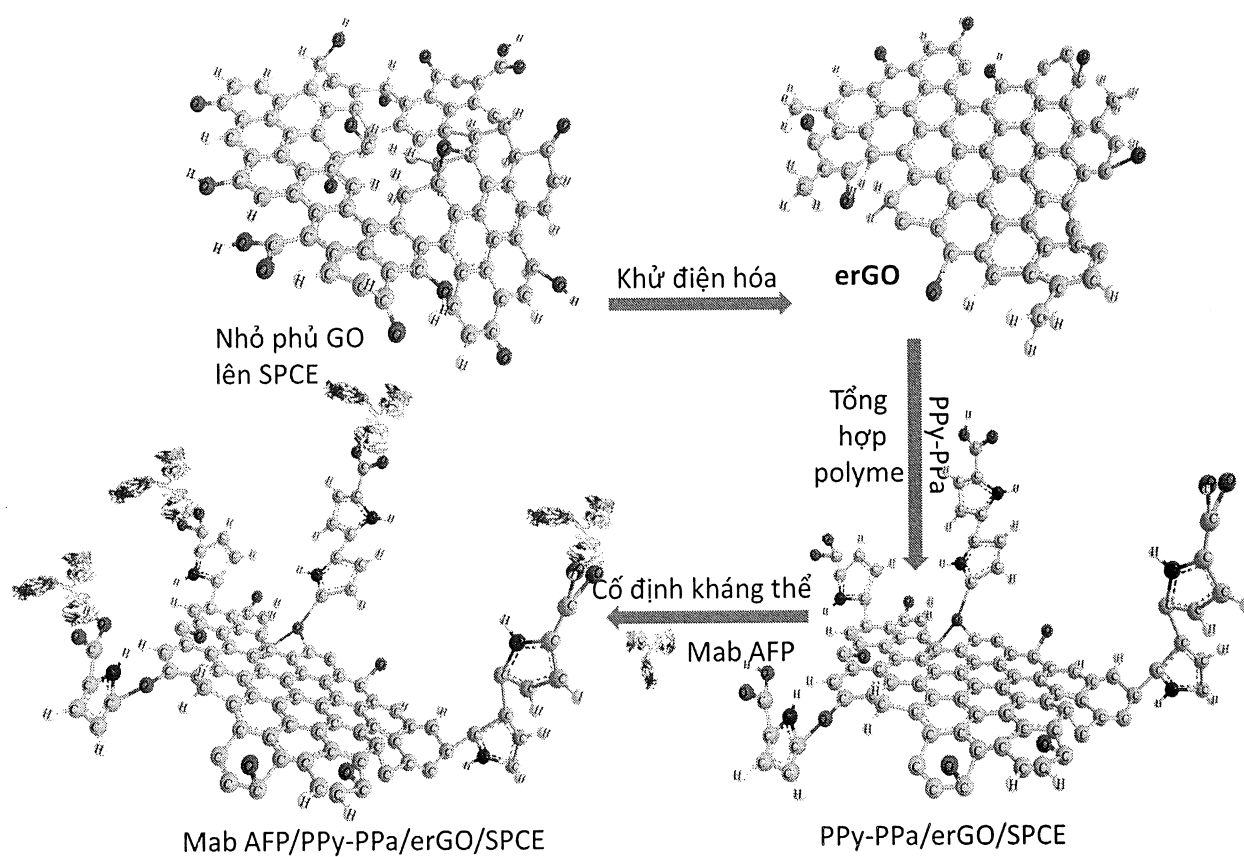
- Polyme đồng trùng hợp PPy-PPa đã tăng được tính thấm ướt bề mặt so với polyme PPy thuần và cải thiện được độ dẫn so với polyme PPa thuần. Tại nồng độ mol tối ưu của Pa so với Py cho màng polyme đồng trùng hợp có đáp ứng điện hóa tốt.
- Phương pháp khử điện hóa GO tạo erGO trên SPCE không sử dụng hóa chất độc hại và thời gian được rút ngắn rất nhiều so với phương pháp hóa học. Thời gian cần thiết khi sử dụng phương pháp điện hóa chỉ cỡ 1,5 giờ trong khi đó nếu sử dụng phương pháp hóa học sẽ mất khoảng 1 đến 2 ngày.
- Lớp erGO trên SPCE giúp cải thiện độ dẫn cũng như làm tăng diện tích bề mặt riêng của điện cực, qua đó cải thiện đặc tính nhạy của cảm biến.

Theo quy trình chế tạo cảm biến miễn dịch điện hóa của sáng chế, có thể phát triển được cảm biến sinh học ứng dụng trong chẩn đoán bệnh sớm.

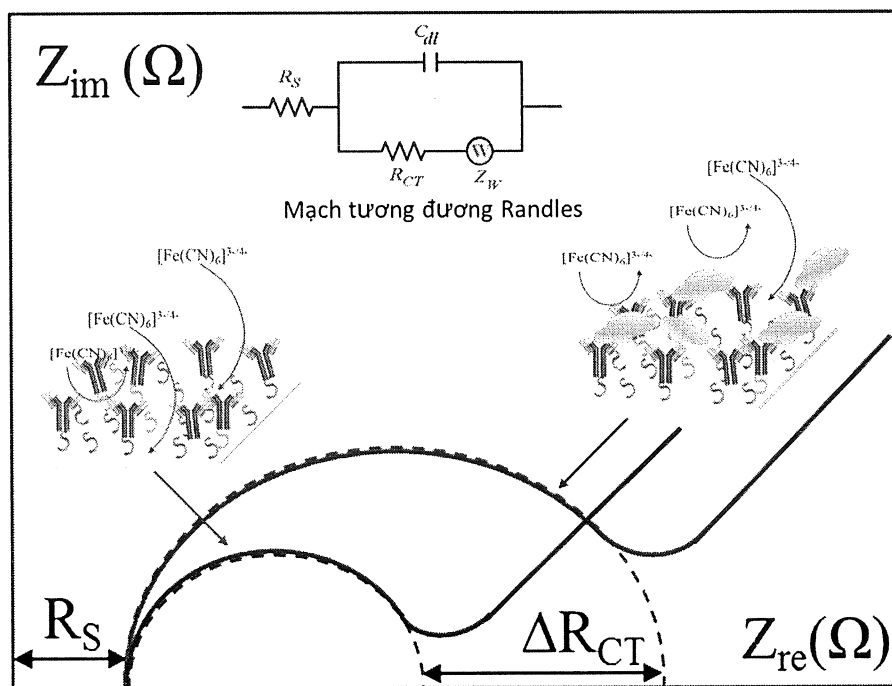
Phân trên đã mô tả chi tiết sáng chế theo một số khía cạnh và phương án ưu tiên thực hiện, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các nội dung bộc lộ trong phần này. Cần hiểu rằng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dựa trên các nội dung bộc lộ này để đưa ra các cải biến, thay đổi đối với các khía cạnh, phương án của sáng chế và các cải biến, thay đổi như vậy đều không nằm ngoài phạm vi bộc lộ của sáng chế. Phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế được trình bày ở phần yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

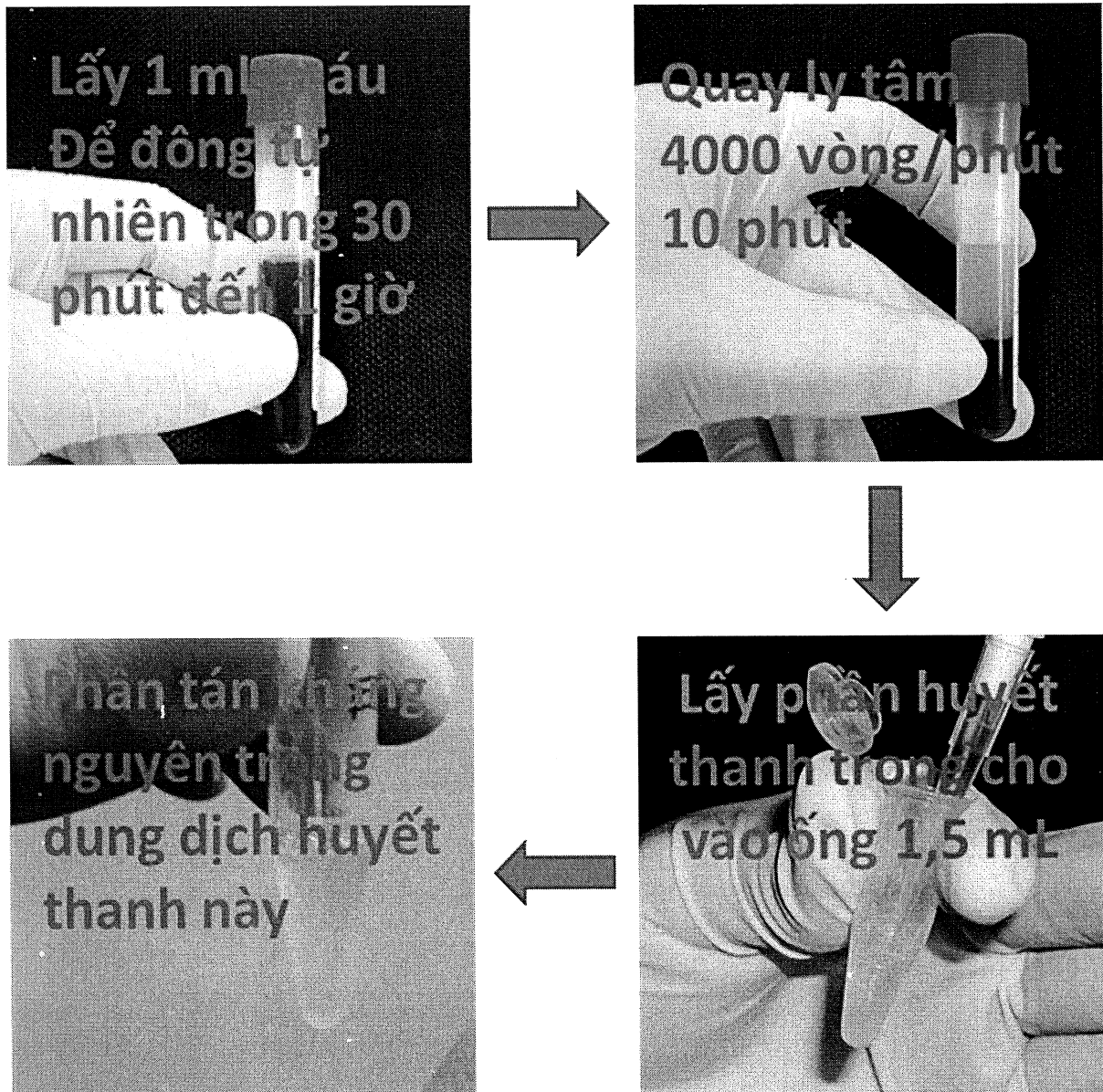
1. Quy trình tổng hợp vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp polypyrrol-polypyrrol carboxyl (PPy-PPa) và oxít graphen dạng khử điện hóa (erGO) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong chẩn đoán bệnh sớm, quy trình này bao gồm các bước:
 - (i) nhả phủ oxít graphen (GO) với nồng độ GO $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ lên điện cực SPCE (Screen-printed carbon ink electrode - điện cực mực in các bon);
 - (ii) khử điện hóa GO thành erGO trên bề mặt điện cực SPCE, trong đó GO được khử điện hóa thành erGO trong dung dịch PBS 100 mM (pH 6,6) và tiến hành quét thế phân cực vòng (CV) từ 0 đến -1,5 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl với số vòng quét tối ưu là 20, tốc độ quét là 50 mV/s;
 - (iii) tổng hợp polyme đồng trùng hợp PPy-PPa trên điện cực erGO/SPCE theo phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn, trong đó màng polyme đồng trùng hợp PPy-PPa được tổng hợp bằng phương pháp quét thế vòng tuần hoàn với tỷ lệ mol monome tối ưu Pa/Py (2-pyrrol-carboxyl axit /pyrrol) là 1/3;
2. Vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều giữa polyme đồng trùng hợp PPy-PPa và erGO ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong chẩn đoán bệnh sớm thu được từ quy trình theo điểm 1.
3. Cảm biến sinh học, trong đó cảm biến này bao gồm vật liệu lai cấu trúc nano hai chiều theo điểm 2.



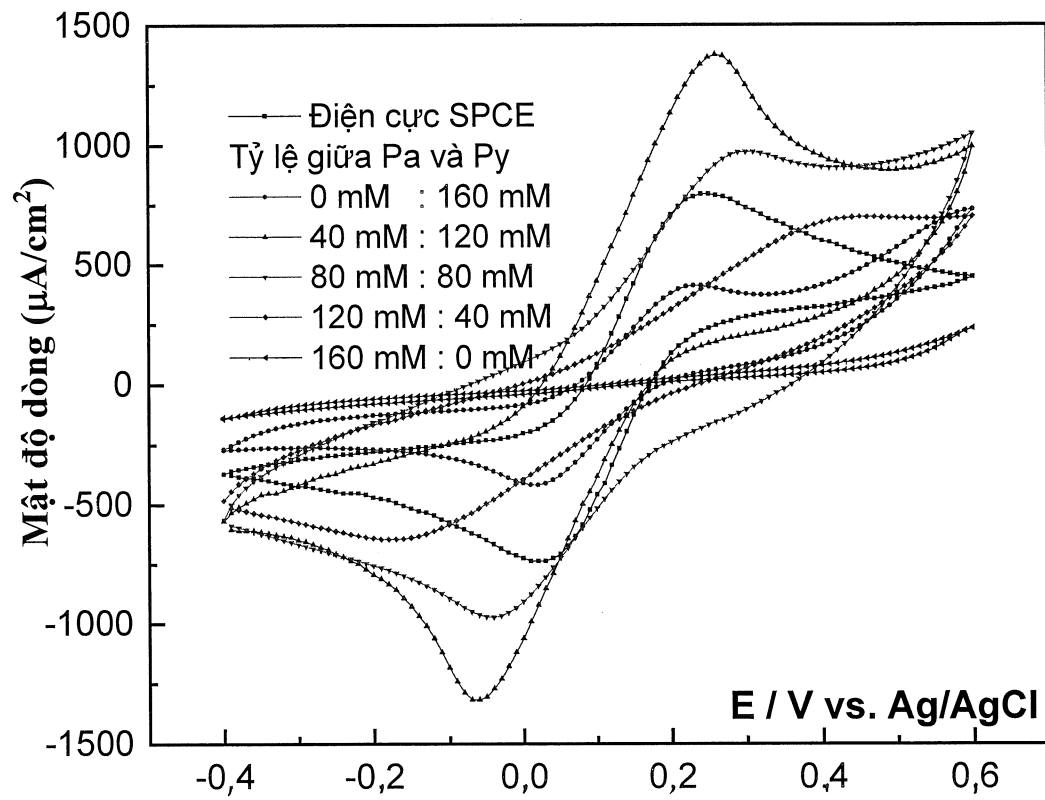
Hình 1



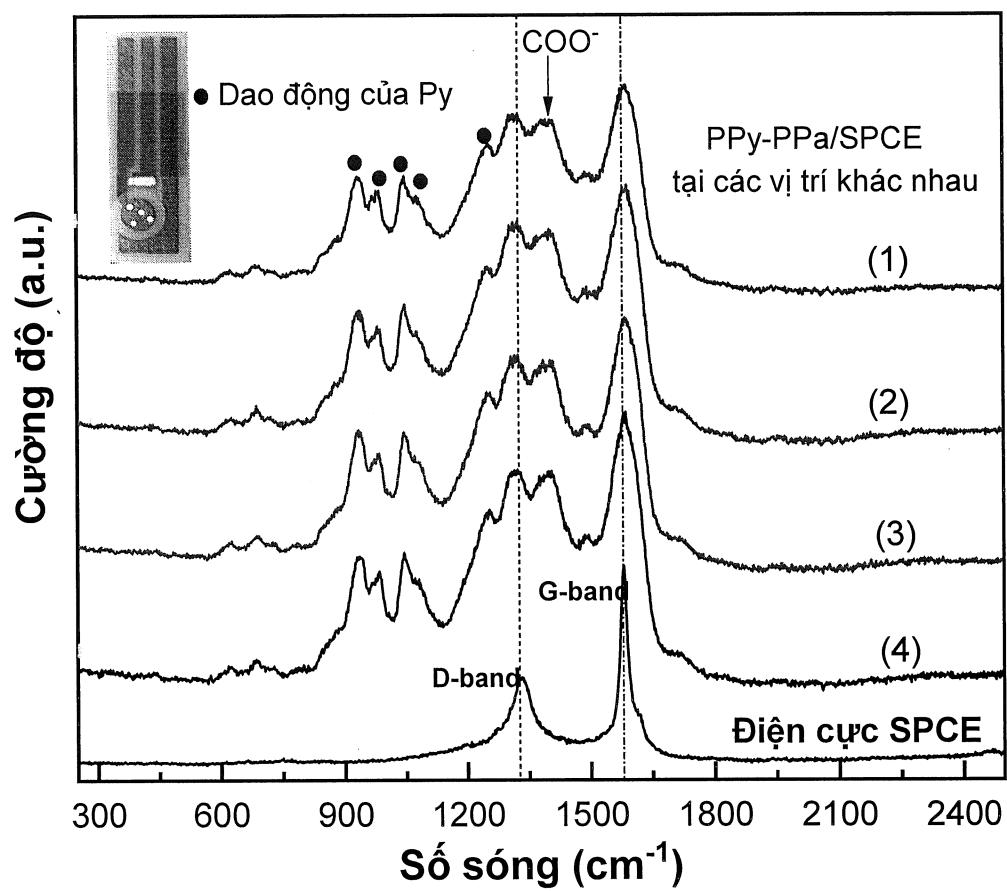
Hình 2



Hình 3



Hình 4



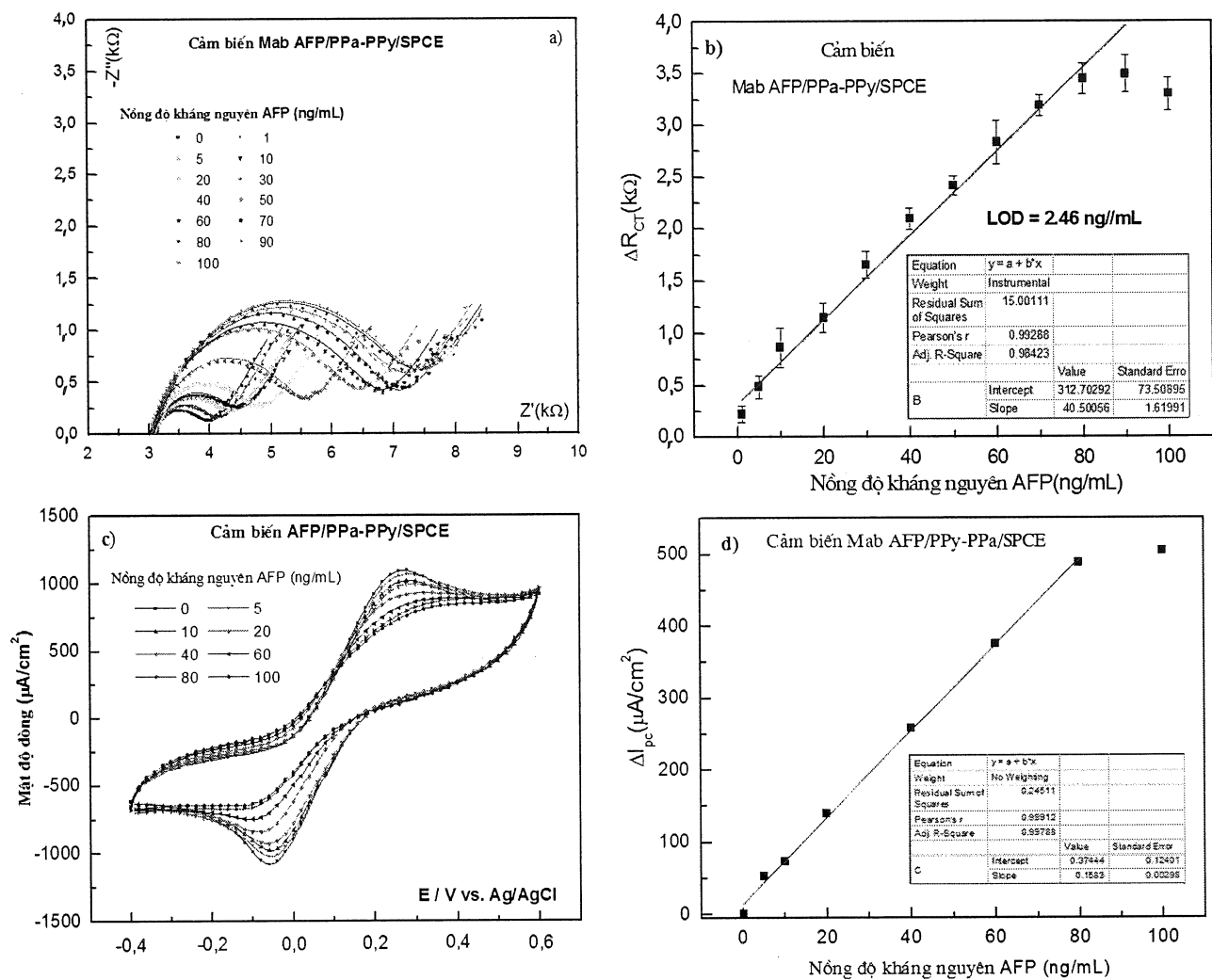
Hình 5

Bảng 1

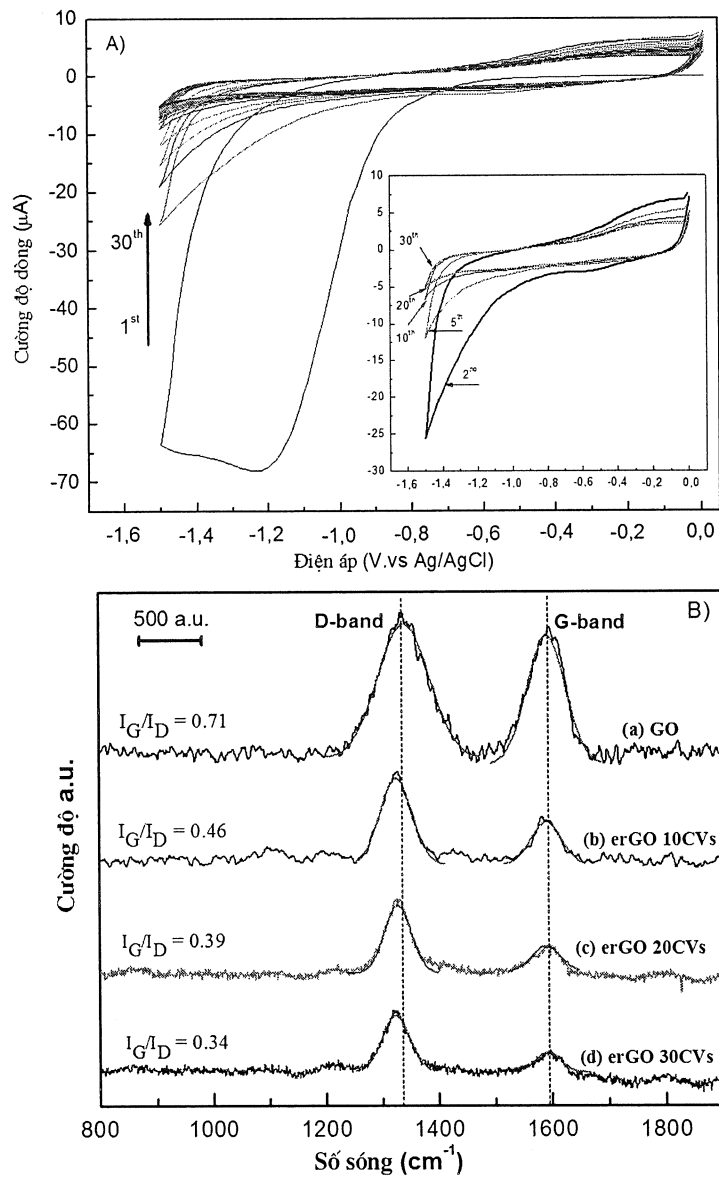
STT	Thực nghiệm (cm^{-1})	Lý thuyết (cm^{-1})	Nhóm chức - Liên kết
1	933-936	932	Biến dạng mạch vòng liên kết với dication
2	980-982	975	Biến dạng mạch vòng liên kết với gốc cation
3	1042-1046	1040	δ (mặt đối xứng C-H) liên kết với gốc cation
4	1080-1083	1085	δ (mặt đối xứng C-H) liên kết với dication
5	1250-1258	1255	δ (mặt bất đối xứng C-H)
6	1320-1335	1350	ν (mặt bất đối xứng C-N) - G band
7	1398-1400	1400	Dao động hóa trị đối xứng của nhóm COO^-
8	1580-1585	1585	$\nu(\text{C}=\text{C})$ - D band

ν : dao động kéo; δ : dao động uốn;

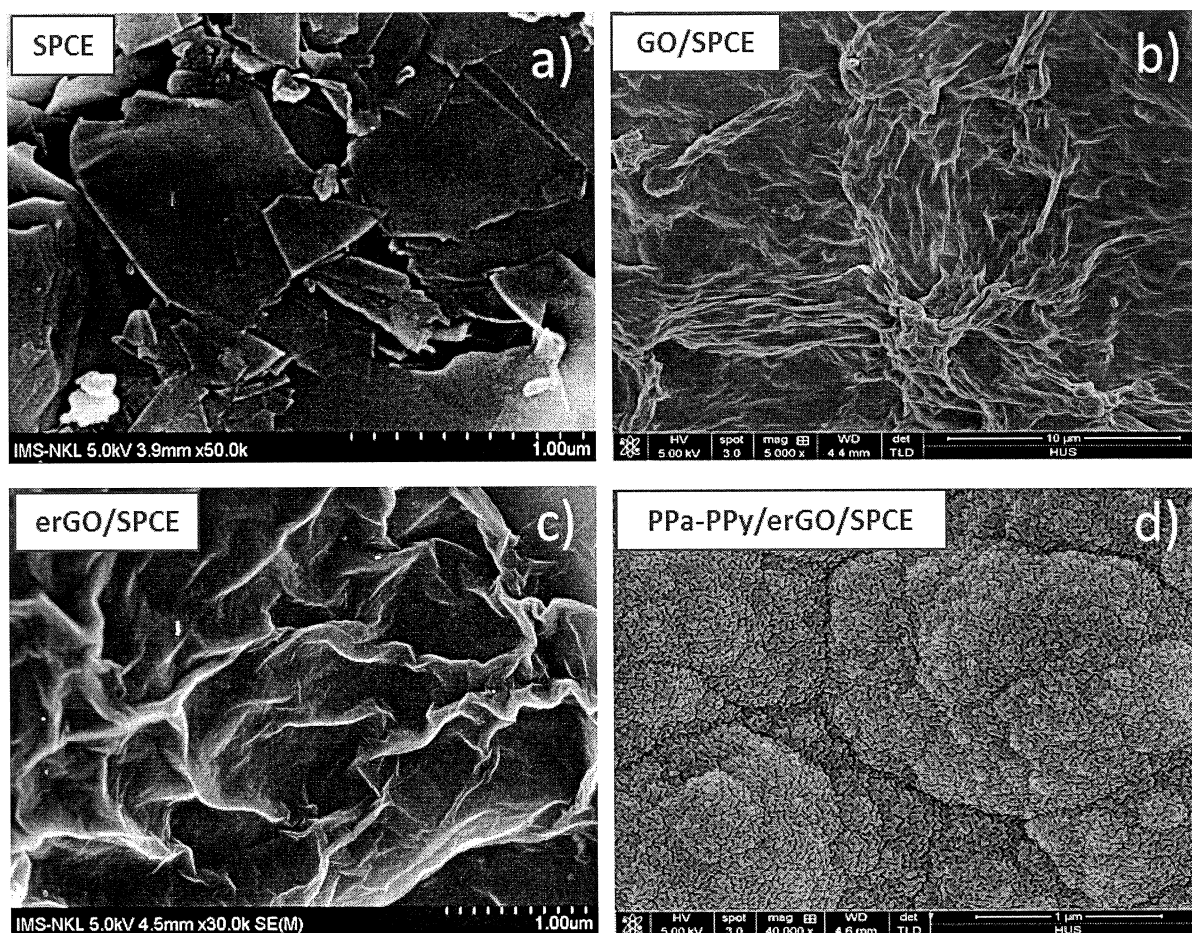
Hình 6



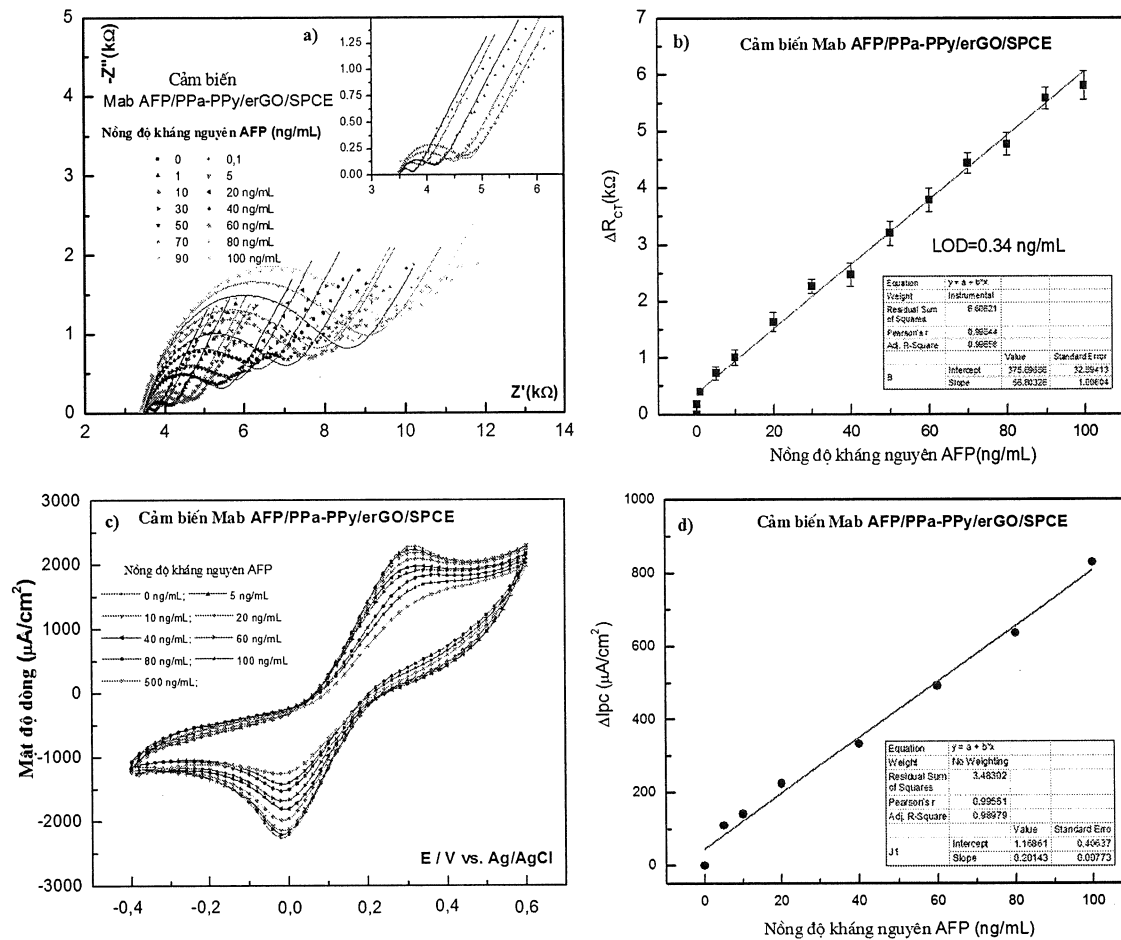
Hình 7



Hình 8



Hình 9



Hình 10