



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

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

(11) 
2-0002025

(51)⁷ **G01N 33/58, 33/551, C12N 15/115**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00428

(22) 21.12.2015

(67) 1-2015-04877

(30) 1-2015-04877 21.12.2015 VN

(45) 27.05.2019 374

(43) 25.05.2016 338

(73) **VIỆN VẬT LÝ, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
(VN)**

Nhà 2H, 18C Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Trần Hồng Nhung (VN), Vũ Văn Sơn (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHỨC HỆ HẠT NANO VÀNG VÀ APTAMER BỌC
POLYETYLEN GLYCOL ĐƯỢC THIOL HÓA ĐƠN CHỨC**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phức hệ hạt nano vàng và aptamer bọc polyetylen glycol thiol hóa đơn chức năng (dưới đây gọi là PEG-SH) làm đầu dò cho các phép phân tích, theo đó bằng cách bọc kín các vị trí trống (không có aptamer) của bề mặt phức hệ hạt vàng@aptamer bằng PEG thiol hóa đơn chức năng giúp kéo dài thời gian bảo quản của phức hệ, nâng cao hiệu quả của các phép phân tích. Quy trình này bao gồm các bước:

(i) xử lý cầu disulfit (-S-S-) trên đầu 5' của aptamer để tạo gốc thiol tự do bằng dithiothreitol (DTT) bằng cách trộn DTT với aptamer với tỷ lệ mol DTT: aptamer là 0,9:1, ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ để tạo ra hỗn hợp aptamer đã thiol hóa;

(ii) bổ sung hạt nano vàng vào hỗn hợp aptamer đã thiol hóa thu được ở bước (i), ủ lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C để tạo ra phức hệ hạt nano vàng@aptamer;

(iii) bổ sung polyetylen glycol được thiol hóa đơn chức (PEG-SH) vào phức hệ hạt nano vàng@aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4°C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư thừa như DTT, aptamer, PEG-SH, thu được phức hệ hạt nano vàng@aptamer được bọc PEG; và

(iv) phân tán phức hệ này trong đệm Tris HCl có độ pH bằng 8 hoặc nước vô trùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phức hệ giữa hạt nano vàng và aptamer làm đầu dò trong các ứng dụng đánh dấu y-sinh và phân tích sinh- hóa như: hiện ảnh tế bào bệnh, cảm biến sinh-hóa.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Công nghệ nano ngày càng phát triển và tạo nên một cuộc cách mạng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khoa học và cuộc sống. Các nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong y-sinh đã mở ra một hướng mới: chẩn đoán nano ở mức độ phân tử, gen. Ưu điểm nổi bật của chẩn đoán nano là tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Các kết quả chẩn đoán ở mức độ phân tử cho phép phát hiện bệnh sớm, ở giai đoạn hình thành, điều mà các phép chẩn đoán truyền thống không thể làm được. Các nano tinh thể phát quang chính được sử dụng trong đánh dấu sinh học là: các chấm lượng tử, các hạt nano đất hiếm, các hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ, hoặc hạt nano vàng. Các hạt nano này thường có độ chói hoặc khả năng tán xạ gấp hàng trăm, nghìn lần phân tử màu hữu cơ – chất đánh dấu sinh học truyền thống. Để sử dụng các hạt nano làm chất đánh dấu sinh học, phải gắn kết các hạt này với các phân tử sinh học để tạo thành các phức hệ. Nếu các nano được gắn kết với các chất nhận biết sinh học như kháng thể, peptit hoặc aptamer, chúng sẽ trở thành các đầu dò để phát hiện tế bào bệnh.

Aptamer là các axit nucleotit (chuỗi ADN hoặc ARN đơn) có thể bám vào đích với ái lực và độ đặc hiệu lớn. Từ khi các phát hiện về aptamer của Ellington và Louis được công bố và sau đó công nghệ chế tạo aptamer từ gen SELEX được xác định vào năm 1991, ngày càng có nhiều loại aptamer

được chế tạo có khả năng bám vào các phối tử (ligand) đích khác nhau, từ các ion nhỏ, đơn phân tử, cho tới các protein, thậm chí cả các tế bào. Aptamer được coi như một chất “nhận biết – thụ cảm” có nhiều hứa hẹn trong các ứng dụng phát hiện các phân tử sinh học, sưu tập và phát hiện tế bào, hiện ảnh và các ứng dụng lâm sàng khác.

Vì vậy, việc gắn kết các hạt nano quang với aptamer làm đầu dò sinh học là vấn đề nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm phát triển

US20060014172 A1 mô tả quy trình chế tạo các aptamer, các phức hệ hạt nano- aptamer, các phương pháp phân tích, phát hiện các tế bào đích, mục tiêu cần phân tích. Các aptamer được chức năng hóa với các nhóm chức khác nhau như: thiol, amin, cacboxyl, biotin, v.v.. Hạt nano được chế tạo từ các vật liệu như kim loại (vàng, bạc, đồng, platin), vật liệu bán dẫn (CdSe, CdS) hay vật liệu từ tính (ferromagnetit, v.v.). Hạt nano được gắn kết với aptamer dựa trên phản ứng hóa học của các nhóm chức hoặc dựa trên ái lực liên kết giữa biotin-avidin, biotin-streptavidin.

Phức hệ hạt nano vàng – aptamer (sau đây gọi là vàng@aptamer) được miêu tả trong các sáng chế đã công bố không xử lý các vị trí trống trên bề mặt hạt nano sau khi gắn kết với aptamer, do đó thường dẫn đến việc các phức hệ không bảo quản được lâu, bị tụ đám trong các đệm sinh học và các bắt cặp không đặc hiệu với kháng nguyên trong quá trình đánh dấu, làm cho kết quả hiện ảnh hoặc phân tích bị sai lệch. Do đó, có nhu cầu về quy trình tạo phức hệ nano- aptamer khắc phục được các nhược điểm nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục nhược điểm nêu trên, cụ thể là đề xuất quy trình sản xuất phức hệ hạt nano vàng với aptamer, mà phức hệ thu được được xử lý chỗ trống trên bề mặt, nhờ thế ngăn được hiện tượng tụ đám của phức hệ, tăng độ chính xác của phương pháp phân tích y-sinh sử dụng phức hệ này.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất phức hệ hạt nano vàng và aptamer (vàng@aptamer) gắn polyetylen glycol được thiol hóa đơn chức (dưới đây gọi tắt là PEG-SH), dùng làm đầu dò cho các phương pháp phân tích y-sinh, quy trình này bao gồm các bước:

(i) xử lý cầu disulfit (-S-S-) trên đầu 5' của aptamer để tạo gốc thiol tự do bằng dithiothreitol (DTT) bằng cách trộn DTT với aptamer với tỷ lệ mol DTT: aptamer là 0,9:1, ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ để tạo ra hỗn hợp aptamer đã thiol hóa;

(ii) bổ sung hạt nano vàng vào hỗn hợp aptamer đã thiol hóa thu được ở trên, ủ lắ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C để tạo ra phức hệ hạt nano vàng@aptamer;

(iii) bổ sung polyetylen glycol được thiol hóa (PEG-SH) vào phức hệ hạt nano vàng@aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4°C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư thừa như DTT, aptamer, PEG-SH, thu được phức hệ hạt nano vàng@aptamer được bọc PEG; và

(iv) phân tán phức hệ này trong đệm Tris HCl có độ pH bằng 8 hoặc nước vô trùng.

Theo một phương án, aptamer là oligonucleotit.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là mô hình phức hệ hạt nano gắn kết với aptamer được bọc PEG: aptamer một đầu được chức năng hóa có nhóm chức thiol (-SH) được gắn lên hạt nano. Hạt nano sau khi gắn kết với aptamer được bọc kín các vị trí trống bằng PEG đơn chức.

Hình 2 là sơ đồ quy trình tạo phức hệ hạt nano vàng@aptamer, trong đó aptamer có cầu disulfit trên đầu 5', PEG được thiol hóa đơn chức.

Hình 3 là hình ảnh hiển vi trường tối của các tế bào BT-474: a) tế bào không ủ, b) tế bào ủ với phức hệ hạt nano vàng@aptamer đặc hiệu HER2 và c) tế bào ủ với hạt nano vàng được bọc PEG (đối chứng).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Hạt nano vàng sử dụng trong giải pháp hữu ích này có dạng hình cầu, kích thước 20 nanomet; aptamer ADN dạng sợi đơn được chức năng hóa một đầu để gắn lên trên hạt nano. Các vị trí trống trên hạt nano được xử lý bọc kín bằng PEG đơn chức năng.

Aptamer là các axit nucleotit (chuỗi ADN hoặc ARN đơn) có thể bám vào kháng nguyên đích với ái lực và độ đặc hiệu lớn. Theo một phương án, aptamer là oligonucleotit. Trong giải pháp hữu ích này, các tác giả ưu tiên sử dụng aptamer đặc hiệu kháng nguyên HER2 trên tế bào ung thư vú có cầu disulfit (-S-S-) ở đầu 5' có cấu trúc như sau:

(S-S)-5'-

AGCCGCGAGGGGAGGGATAGGGTAGGGCGCGGCT-3'

PEG có công thức phân tử: $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, PEG là một polyme có tính trơ về mặt hóa học và có tính tương thích sinh học cao, loại PEG đơn chức thích hợp dùng trong giải pháp hữu ích là loại PEG được chức năng hóa bằng một nhóm chức thiol (PEG-SH). Tốt nhất nếu trọng lượng phân tử của PEG là 1kDa.

Trong giải pháp hữu ích này, phức hệ vàng@aptamer được chế tạo dựa trên phản ứng hóa học đặc trưng của nhóm thiol với nguyên tố vàng. Điều khác biệt của phức hệ vàng@aptamer trong giải pháp hữu ích này là phức hệ đã được xử lý vị trí trống bằng cách bọc PEG đơn chức năng. Bản chất của việc bọc PEG đơn chức năng lên vị trí trống của phức hệ là phản ứng hóa học tạo liên kết giữa nhóm chức trên PEG với vị trí trống trên bề mặt hạt nano trong phức hệ. Cụ thể là đối với phức hệ nano vàng@aptamer: PEG được chức năng hóa với nhóm thiol. Phản ứng đặc trưng của nhóm thiol với

nguyên tố vàng được xảy ra, qua đó tạo liên kết Au-S-PEG giữa PEG với các nguyên tử vàng tại vị trí trống trên bề mặt của hạt nano vàng trong phức hệ nano vàng@aptamer.

Như thể hiện trên Hình 1 hạt nano vàng có dạng hình cầu, kích thước nanomet; aptamer ADN dạng sợi đơn được chức hóa một đầu để gắn lên trên hạt nano. Các vị trí trống trên hạt nano vàng được xử lý bằng cách gắn kín bằng PEG đơn chức.

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hai công đoạn chính:

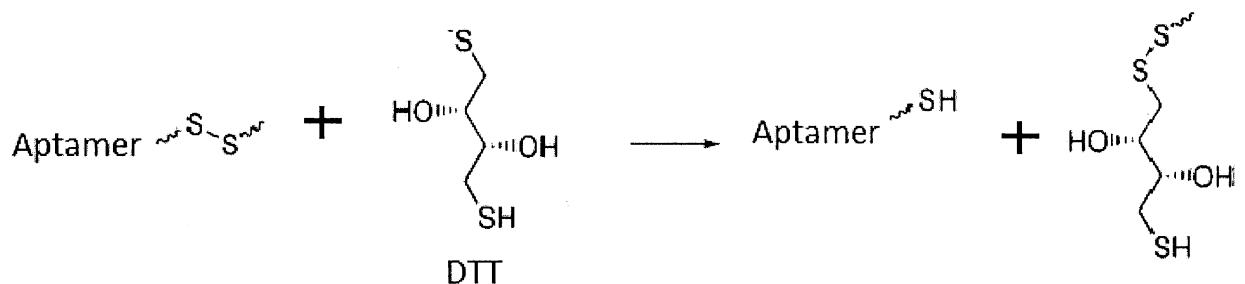
Gắn kết tạo phức hệ giữa các hạt nano vàng và aptamer. Sau công đoạn này, sản phẩm là phức hệ hạt vàng@aptamer có một số nhược điểm như sau: i) thời gian bảo quản không được lâu; ii) bị tụ đám khi phân tán trong các đệm sinh học; iii) bị tụ đám khi ủ với tế bào; iv) bắt cặp với các kháng nguyên không đặc hiệu tế bào đích (do có sự phù hợp ngẫu nhiên giữa các nhóm chức trên bề mặt hạt nano với cấu trúc hóa học của kháng nguyên) dẫn tới việc nhận biết tế bào không đặc hiệu.

Bọc kín các vị trí trống (không có aptamer) của bề mặt hạt nano vàng bằng PEG đơn chức năng. Sản phẩm sau công đoạn này là phức hệ hạt vàng@aptamer được bọc PEG đã khắc phục được các nhược điểm so với phức hệ hạt vàng@aptamer không bọc PEG như: i) thời gian bảo quản lâu, từ 2-3 tháng; ii) dễ dàng phân tán trong các đệm sinh học; iii) không bị tụ đám khi ủ với tế bào; iv) giảm thiểu hiện tượng bắt cặp không đặc hiệu với tế bào đích.

Hình 2 là sơ đồ khối thể hiện vắn tắt các bước tạo ra phức hệ hạt nano vàng và aptamer gắn PEG-SH

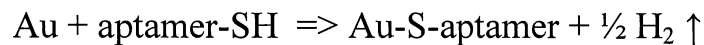
Trước khi gắn kết tạo phức hệ, cần phải xử lý cầu disulfit (-S-S-) trên đầu 5' của aptamer (1) để tạo gốc thiol tự do bằng DTT (2): Trộn 3,29 μ l DTT (2) (nồng độ $1,2 \times 10^{14}$ phân tử/ μ l) với 7 μ l aptamer (1) (nồng độ 100

pmol/ μ l), tỉ lệ aptamer:DTT là 1:0,9; ủ tại nhiệt độ phòng trong thời gian là 1 giờ. Phương trình phản ứng như dưới đây:



Thu được sản phẩm là aptamer có nhóm -SH tự do (3).

Tiếp đó, tạo liên kết giữa hạt nano vàng (4) và aptamer có nhóm -SH tự do (3) bằng phản ứng đặc trưng giữa nguyên tử vàng và nhóm thiol: Trộn 7 μ l aptamer có nhóm -SH tự do (3) (nồng độ 100 pmol/ μ l) với 500 μ l hạt nano vàng (4) (nồng độ $3,5 \times 10^{12}$ hạt/ml). Ủ lắc 2 giờ ở nhiệt độ phòng bằng máy lắc Vortex. Sau đó ủ qua đêm ở 4°C. Thu được phức hệ hạt nano vàng@aptamer (5). Phương trình phản ứng như sau:



Bước cuối cùng là công đoạn xử lý các vị trí trống trên bề mặt hạt nano trong phức hệ hạt nano vàng@aptamer (5) bằng PEG-SH (6): Dùng 20 μ l PEG-SH (6) (nồng độ 4×10^{16} phân tử/ μ l, trọng lượng phân tử 1kDa) ủ với 500 μ l phức hệ nano vàng@aptamer (5) ở 4°C trong 5 giờ. Phương trình phản ứng như sau:



Sau đó, rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng ly tâm 10000 vòng/ phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư thừa như DTT, aptamer, PEG trong quá trình chế tạo. Cuối cùng, thu được $1,75 \times 10^{12}$ hạt phức hệ hạt nano vàng@aptamer được gắn PEG-SH (7), phức hệ này được phân tán lại trong 500 μ l đệm Tris HCl pH 8 hoặc nước vô trùng để thu được 500 μ l dung dịch

phức có nồng độ hạt phức hệ là $3,5 \times 10^{12}$ hạt/ml, trong đó chứa aptamer với lượng là 700 pmol.

Mặc dù lượng các chất phản ứng nêu trên được đưa ra dưới dạng trị số định lượng cụ thể, nhưng cần hiểu rằng lượng các chất phản ứng có thể thay đổi theo tỷ lệ định lượng tương quan nêu trên.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: sử dụng phức hệ hạt nano vàng@aptamer

Phức hệ hạt nano vàng@aptamer được tổng hợp với lượng định lượng như mô tả ở trên. Phức hệ hạt nano vàng@aptamer thu được được dùng để đánh dấu và hiện ảnh trường tối của tế bào ung thư vú BT-474 (hình 3). Các tế bào ung thư vú BT-474 được ủ với các hạt nano vàng bọc PEG (làm đối chứng) và phức hệ hạt nano vàng@aptamer trong 24 giờ (200.000 tế bào ung thư vú BT-474 ủ với 10^{10} phức hệ hạt nano vàng@aptamer). Các tế bào được hiện ảnh bằng kính hiển vi Nikon Ti-E soi ngược trong chế độ trường tối. Hình 3(a) trình bày các ảnh tán xạ của các tế bào BT-474. Một số vị trí trong các tế bào hiển thị các đốm mờ do tán xạ từ các bào quan được phân bố trong tế bào chất và màng, không có sự khác biệt đáng kể giữa ảnh tán xạ của các tế bào khi không có và có sự hiện diện của hạt nano vàng được bọc PEG (hình 3(a) và (c)). Trên ảnh chỉ có các chấm sáng nhỏ, mờ và yếu, chỉ ra rằng không có hoặc có rất ít sự kết tụ của hạt vàng trong các tế bào. Sau khi ủ với phức hệ hạt nano vàng@aptamer, sự thâm nhập của phức hệ vào trong tế bào làm xuất hiện của các đốm sáng rõ trong tế bào chất. Sự tụ đám của phức hệ tạo thành các điểm sáng cho phép xác định từng tế bào riêng lẻ (hình 3(b)).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Các phức hệ vàng@aptamer được bọc PEG đơn chức năng có thời gian bảo quản lâu từ 2-3 tháng, không bị tụ đám trong các đệm sinh học, không bị tụ đám khi ủ với tế bào, tính đặc hiệu cao.

Các phức hệ hạt vàng@aptamer có thể dùng làm đầu dò với tính đặc hiệu cao trong các ứng dụng đánh dấu sinh - hóa như: hiện ảnh tế bào, cảm biến sinh - hóa. ái lực cao của aptamer với kháng nguyên cho phép phát hiện tế bào bệnh ở mức độ phân tử. Tiết diện tán xạ lớn của hạt nano vàng làm nâng cao độ nhạy của phép phân tích và tạo khả năng phát hiện bệnh sớm.

Phức hệ hạt nano vàng@aptamer được sử dụng trong nghiên cứu dùng phương pháp quang nhiệt để tiêu diệt tế bào bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phức hệ hạt nano vàng và aptamer (vàng@aptamer) bọc polyetylen glycol (PEG, polyethylen glycol) làm đầu dò cho các phép phân tích, quy trình này bao gồm các bước:

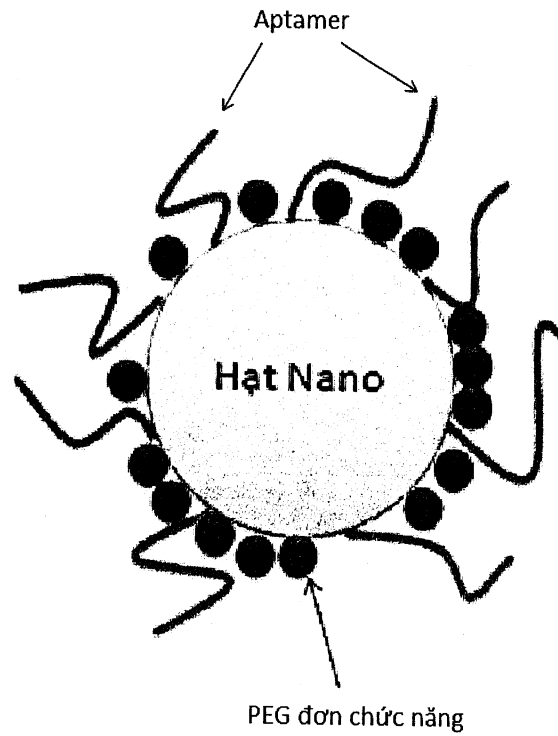
(i) xử lý cầu disulfit (-S-S-) trên đầu 5' của aptamer để tạo gốc thiol tự do bằng dithiothreitol (DTT) bằng cách trộn DTT với aptamer với tỷ lệ mol DTT: aptamer là 0,9:1, ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ để tạo ra hỗn hợp aptamer đã thiol hóa;

(ii) bổ sung hạt nano vàng vào hỗn hợp aptamer đã thiol hóa thu được ở bước (i), ủ lắng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C để tạo ra phức hệ hạt nano vàng@aptamer;

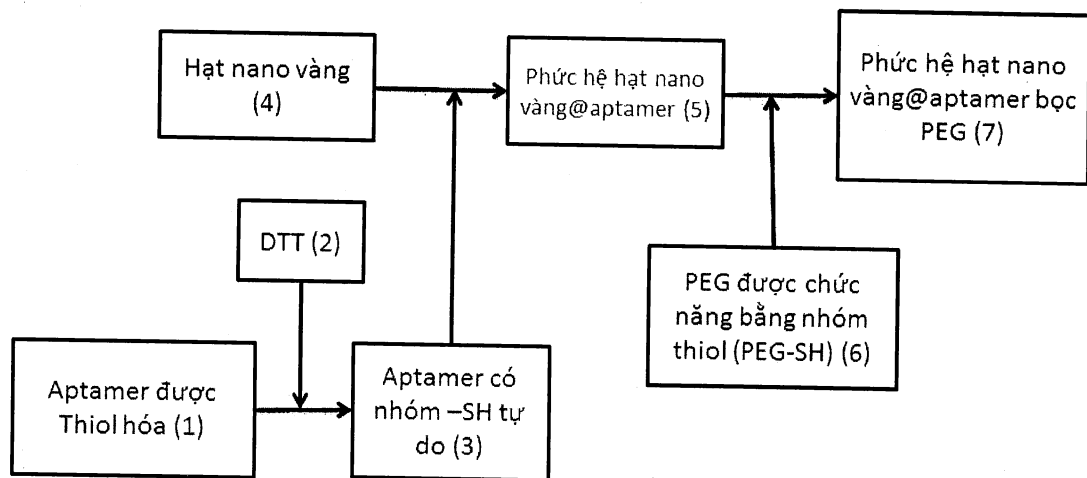
(iii) bổ sung polyetylen glycol được thiol hóa đơn chức (PEG-SH) vào phức hệ hạt nano vàng@aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4°C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư thừa như DTT, aptamer, PEG-SH, thu được phức hệ hạt nano vàng@aptamer được bọc PEG; và

(iv) phân tán phức hệ này trong đệm Tris HCl có độ pH bằng 8 hoặc nước vô trùng.

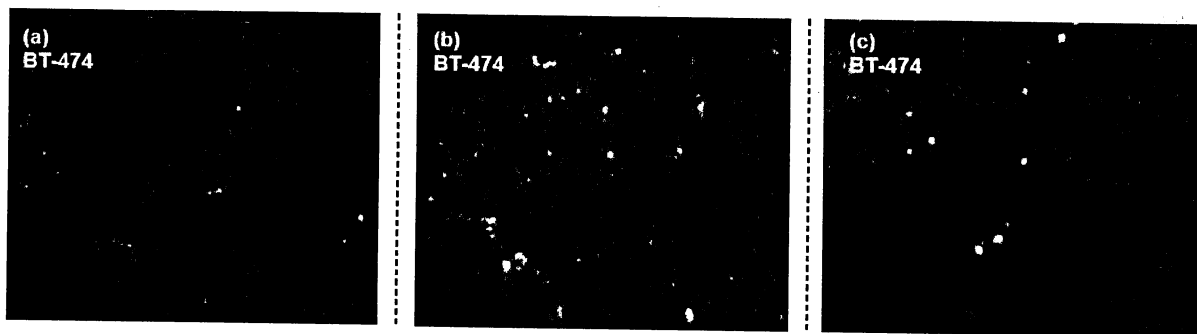
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó aptamer là oligonucleotit.



Hình 1



Hình 2



Hình 3