



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0022078

(51)⁷ **G01N 33/00, C12Q 1/00**

(13) **B**

(21) 1-2017-04970

(22) 08.12.2017

(45) 25.10.2019 379

(43) 26.02.2018 359

(73) 1. **TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI (VN)**
Số 1, Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

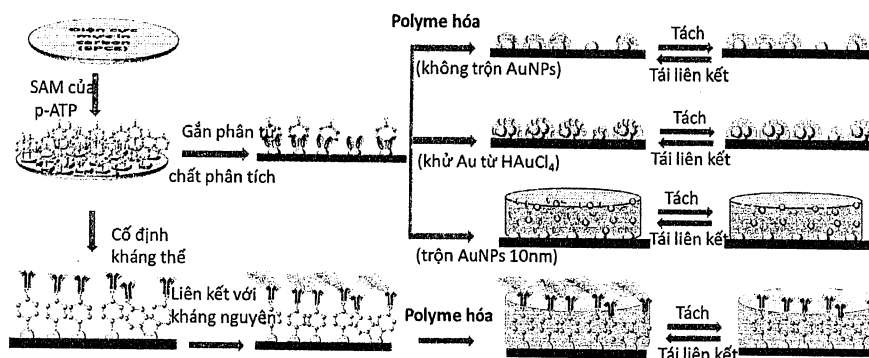
2. **TRƯỜNG THỊ NGỌC LIÊN (VN)**

Phòng 702, Tòa nhà CT6A, khu đô thị Đặng Xá, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội

(72) **Trương Thị Ngọc Liên (VN), Nguyễn Quốc Hảo (VN), Hoàng Trung Anh (VN), Nguyễn Vũ Quỳnh (VN)**

(54) **QUY TRÌNH CHẾ TẠO ĐẦU THU SINH HỌC NHÂN TẠO SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ POLYME IN PHÂN TỬ (MIP) ỨNG DỤNG CHẾ TẠO CẢM BIẾN SINH HỌC TRONG AN TOÀN THỰC PHẨM VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH SỚM**

(57) Sáng chế đề xuất quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo (artificial bioreceptor) dựa trên công nghệ polyme in phân tử (MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán sớm bệnh. Theo quy trình này, đầu thu sinh học nhân tạo MIP được chế tạo trên nền điện cực mực in cacbon được phủ một lớp AuNPs phân tán trên bề mặt. Lớp AuNPs này sẽ làm tăng diện tích hiệu dụng bề mặt điện cực dẫn đến làm tăng số lượng các phân tử chất phân tích in được vào màng polyme. Hơn nữa với lớp AuNPs phân bố đều trên bề mặt trên điện cực sẽ giúp tạo được một đơn lớp monome định hướng trên điện cực, giúp quá trình hình thành màng polyme có độ đồng nhất bề mặt cao, mỏng nên dễ dàng tách các phân tử chất phân tích đã in vào màng trong quá trình polyme hóa để hình thành các khuôn nhận dạng sinh học đặc hiệu, làm tăng hiệu suất chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP.



Lĩnh vực kỹ thuật đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình công nghệ chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo (artificial bioreceptor) dựa trên công nghệ polyme in phân tử (molecularly imprinted polymer-MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán sớm bệnh. Đầu thu sinh học nhân tạo được gắn trên điện cực mực in cacbon SPCE (screen-printed carbon ink electrode) phủ lớp hạt nano vàng (AuNPs) phân tán trên bề mặt. Tín hiệu của cảm biến được xác định bằng phương pháp đo phổ trở kháng phức (electrochemical impedance spectroscopy - EIS). Điện cực SPCE chế tạo theo công nghệ in lưới màng dày với mực in là cacbon có kích thước nhỏ (cỡ micro mét) trộn với chất kết dính. Điện cực SPCE có giá thành rẻ, linh hoạt trong thiết kế và dễ dàng tích hợp với thiết bị đo cầm tay.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Công nghệ polyme in phân tử (MIP) cho phép thiết kế và chế tạo các đầu thu sinh học nhân tạo có tính chọn lọc và độ đặc hiệu được xác định trước, ứng dụng trong các lĩnh vực phân tách, phân tích, xúc tác hay cảm biến sinh hóa. MIP thường sử dụng ma trận polyme kết hợp giữa chất cần phân tích và các gốc monome (monomer). Sau khi loại bỏ các chất phân tích (được gọi là khuôn mẫu) màng polyme sẽ xuất hiện các khuôn nhận dạng phân tử rất mạnh. Tại một số vị trí của khuôn có đính các liên kết có tính chọn lọc tương tự như đầu thu sinh học tự nhiên như kháng nguyên, kháng thể hoặc enzyme. Độ chọn lọc của MIP khá cao do dựa vào các yếu tố hình dạng, kích thước và các nhóm chức hóa học của chất phân tích. Chính vì vậy, MIP không chỉ nhận diện các chất sinh học mà còn đặc biệt hữu ích với các chất hóa học. Ưu điểm của đầu thu sinh học nhân tạo MIP có độ bền và ổn định cao hơn so với các đầu thu sinh

học tự nhiên trong các môi trường khắc nghiệt như độ pH quá cao hoặc quá thấp, áp suất cao hay nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp. MIP có thể sử dụng được trong nhiều tháng mà không có tổn thất về hiệu quả sử dụng cũng như yêu cầu bảo quản đơn giản hơn so với chất sinh học tự nhiên. Do những đặc tính này, MIP đã thu hút sự chú ý ngày càng tăng của các nhà nghiên cứu thông qua số lượng các bài báo tăng hàng năm. MIP được xem như lựa chọn thay thế đầy hứa hẹn cho các đối tác sinh học của chúng để phát triển các hướng mới trong các lĩnh vực nghiên cứu đa ngành như sắc ký, công nghệ sinh học, khoa học môi trường, an toàn thực phẩm và đặc biệt trong cảm biến sinh học. Tuy nhiên, việc ứng dụng MIP trong cảm biến sinh học vẫn còn tồn tại một số hạn chế cần khắc phục trước khi đưa ra sản phẩm thương mại. Trước hết, tính không đồng nhất của các vị trí liên kết có thể gây ra tương tác không đặc hiệu và do đó làm giảm chất lượng của tín hiệu. Để khắc phục vấn đề này, một số nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tổ hợp và tính toán để lựa chọn tỷ lệ monome và phân tử chất phân tích. Thứ hai, tính chất ngẫu nhiên của quá trình polyme hóa cũng có thể ảnh hưởng đến tính đồng nhất trong việc phân bố các khuôn in trong mạng polyme, gây ra sự biến thiên không mong muốn trong khuếch tán. Để khắc phục nhược điểm này, một số phương pháp đã được áp dụng để cải thiện MIP như chuyển đổi chuỗi phân mảnh bổ sung đảo ngược (Reversible addition-fragmentation chain transfer), phản ứng trùng hợp chuyển hóa gốc nguyên tử (atom transfer radical polymerisation), khởi tạo lắng đọng hơi hóa học (Initiated chemical vapour deposition) và gắn hóa học (click-chemistry). Ngoài ra, một số phương pháp mới cũng đã được phát triển như cấu trúc lõi-vỏ, vật liệu composit lai giữa hữu cơ và vô cơ, kỹ thuật màng mỏng và quang khắc “mềm” (soft-photolithography) để tạo khuôn. Để tăng cường tín hiệu của cảm biến và mở rộng phạm vi ứng dụng, một số hình mẫu của cảm biến ứng dụng MIP đã được phát triển bao gồm đơn chất phân tích trên nhiều đế, đa chất phân tích trên mảng đế đơn, chip vi dòng và các hệ thống lab - on - valve. Tuy nhiên, cảm biến MIP vẫn cần các giải pháp thỏa đáng về cách thức chúng có thể được sản xuất và tích hợp một cách kinh tế vào các thiết bị hiện tại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất đầu thu sinh học nhân tạo MIP khắc phục được các nhược điểm nêu trên, và đầu thu theo sáng chế có thể được sản xuất và tích hợp dễ dàng vào các thiết bị liên quan hiện có.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo (artificial bioreceptor) dựa trên công nghệ polyme in phân tử (MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán sớm bệnh. Theo quy trình này, đầu thu sinh học nhân tạo MIP được chế tạo trên nền điện cực mực in cacbon được phủ một lớp AuNPs phân tán trên bề mặt. Lớp AuNPs này sẽ làm tăng diện tích hiệu dụng bề mặt điện cực dẫn đến làm tăng số lượng các phân tử chất phân tích in được vào màng polyme. Hơn nữa với lớp AuNPs phân bố đều trên bề mặt trên điện cực sẽ giúp tạo được một đơn lớp monome định hướng trên điện cực, giúp quá trình hình thành màng polyme có độ đồng nhất bề mặt cao, mỏng nên dễ dàng tách các phân tử chất phân tích đã in vào màng trong quá trình polyme hóa để hình thành các khuôn nhận dạng sinh học đặc hiệu, làm tăng hiệu suất chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP. Trái với công nghệ hiện tại, đầu thu sinh học MIP thường được tiến hành trên các điện cực kim loại, cấu trúc MIP được tạo ra thường có dạng đa lớp của đa phân tử phức hợp, gây cản trở quá trình tách phân tử chất phân tích ra khỏi mạng polyme, do đó làm giảm hiệu suất tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP.

Do màng polyme MIP có độ dẫn thấp nên thông thường tín hiệu điện của cảm biến sẽ không cao dẫn tới độ nhạy của cảm biến thấp (tín hiệu cảm biến trên nồng độ chất phân tích). Trong sáng chế này, AuNPs được đưa vào màng polyme ngay trong quá trình polyme tạo MIP dưới một trong các dạng:

- (i) hạt keo vàng kích thước nano, theo một phương án là 10 nm, đã được gắn các monome p-ATP, và
- (ii) hạt nano Au được tạo thành do phản ứng khử Au từ hợp chất HAuCl_4 có trong dung dịch polyme.

Hạt nano Au được đưa vào trong màng polyme có tác dụng cải thiện độ dẫn của màng polyme cũng như làm tăng cường quá trình vận chuyển điện tử

trong mạng polyme do hình thành sự phân bố ba chiều của AuNPs trong ma trận MIP.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất đầu thu sinh học nhân tạo sử dụng công nghệ polyme in phân tử (MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán bệnh sớm được chế tạo bởi quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo (artificial bioreceptor) dựa trên công nghệ polyme in phân tử (MIP) theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất việc ứng dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP theo sáng chế để chế tạo cảm biến sinh học điện hóa phổ tổng trở faradaic dùng trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán sớm bệnh. Cảm biến này hoạt động theo nguyên tắc khi phân tử chất phân tích tới tái liên kết đặc hiệu với đầu thu sinh học nhân tạo trên bề mặt điện cực của cảm biến sẽ hình thành nên một lớp màng điện môi làm tăng trở kháng của hệ điện hóa. Dẫn tới làm tăng giá trị điện trở truyền điện tích (R_{CT}) trong mạch tương đương Randles.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình phân tích mẫu bằng cảm biến điện hóa phổ tổng trở faradaic (EIS) sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP 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 chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP nhận biết các phân tử chất phân tích/hóa học/enzyme/kháng thể.

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

Hình 3: Sơ đồ quy trình xử lý mẫu thực.

Hình 4: Hình vẽ thể hiện ảnh chụp hiển vi điện tử quét (SEM) của bề mặt điện cực: a) MIP/SPAuE (điện cực mực in Au); b) MIP/AuNPs/SPCE; c) MIP có pha tạp hạt keo Au/AuNPs/SPCE và d) MIP pha tạp hạt Au được khử từ $\text{HAuCl}_4/\text{AuNPs/SPCE}$.

Hình 5: Phổ EIS và đường chuẩn của cảm biến xác định kháng sinh nhóm Quinolone Norfloxacin (NOR) sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP a) không trộn hạt Au (cảm biến 1), b) trộn hạt keo vàng kích thước 10 nm (cảm biến 2) và có HAuCl_4 trong dung dịch polyme (cảm biến 3), d) đường đặc trưng chuẩn của 3 cảm biến thể hiện sự phụ thuộc của giá trị ΔR_{CT} và nồng độ kháng sinh NOR cũng như tín hiệu của cảm biến 2 trong môi trường e) chứa kháng sinh khác (bao gồm Levofloxacin-Levo, Ciprofloxacin-CF và Chloramphenicol-CAP) và f) môi trường bao gồm cả kháng sinh NOR và kháng sinh khác (NOR + Levo, NOR + CF, NOR + CAP) cùng nồng độ.

Hình 6: Đặc trưng phổ Raman sau mỗi bước chế tạo đầu thu sinh học NOR-MIP và bảng tần số dao động đặc trưng của liên kết cacbon với cacbon (C-C), liên kết của poly(aminothiophenol) và các nhóm chức của phân tử NOR.

Hình 7: Phổ EIS và đường chuẩn của cảm biến xác định kháng nguyên Enrofloxacin sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên (kháng thể đơn dòng Enrofloxacin) và đầu thu sinh học nhân tạo MIP.

Hình 8: Đặc trưng phổ Raman sau mỗi bước chế tạo đầu thu sinh học MIP phát hiện kháng nguyên Enrofloxacin.

Hình 9: Đặc trưng dòng - thế của cảm biến sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên enzyme HRP phát hiện H_2O_2 và đầu thu nhân tạo MIP nhận biết enzyme HRP.

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.

Hình 1 minh họa quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP.

Trước hết là về quy trình chế tạo đầu thu sinh học MIP trên nền điện cực AuNPs/SPCE. Theo một phương án ưu tiên quy trình này bao gồm các bước sau:

Bước 1: *Tổng hợp AuNPs trên SPCE bằng phương pháp điện hóa quét thế vòng*

Đầu tiên điện cực SPCE được biến tính bởi lớp hạt nano vàng (AuNPs) phân tán đều trên bề mặt bằng phương pháp điện hóa quét thế vòng. Điện cực SPCE được quét 20 vòng trong dung dịch HAuCl_4 nồng độ 100 μM pha trong PBS 100mM (pH 7,4) với điện thế từ -0,65 V đến +0,50 V vs. Ag/AgCl, tốc độ quét là 50 mV/s. Trong quá trình quét thế, ion Au^{3+} trong hợp chất HAuCl_4 sẽ bị khử thành các hạt nano vàng. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy AuNPs được tạo ra theo phương pháp điện hóa có thể tồn tại ở dạng oxit. Để loại bỏ dạng oxit này, điện cực AuNPs/SPCE được quét trong dung dịch H_2SO_4 nồng độ 1 M với điện thế từ -0,2 V đến +1,4 V vs. Ag/AgCl, tốc độ quét là 50 mV/s cho đến khi thu được đáp ứng điện hóa ổn định (thường sau 5 vòng quét).

Bước 2: Tạo màng đơn lớp tự lắp ghép của monome p-aminothiophenol (p-ATP) trên điện cực AuNPs/SPCE bằng phương pháp nhúng phủ

Điện cực AuNPs/SPCE được ngâm trong dung dịch ethanol có chứa monome p-ATP nồng độ 50 mM qua đêm trong buồng tối ở nhiệt độ phòng (khoảng 15 giờ).

Bước 3: Gắn các phân tử chất phân tích lên p-ATP/AuNPs/SPCE bằng lực tĩnh điện

Phân tử cần phân tích được hòa tan trong môi trường dung môi để có được nồng độ 10 mM. Nhỏ 35 μL dung dịch này lên điện cực p-ATP/AuNPs/SPCE và tiến hành áp thế tĩnh -0,6 V vs. Ag/AgCl trong 600 s. Lúc này các nguyên tử N trong nhóm $-\text{NH}_2$ bị proton hóa thành nhóm $-\text{NH}_2^+$ và điện thế âm sẽ kéo các phân tử chất phân tích cùng với nhóm chức $-\text{NH}_2^+$ lại gần bề mặt điện cực.

Bước 4: In phân tử chất phân tích vào màng poly(aminothiophenol)

Dung dịch polyme gồm monome p-ATP và phân tử chất phân tích. Tỷ lệ giữa monome và chất phân tích được lựa chọn 3:1, 5:1 và 6:1. Để đưa hạt nano Au vào mạng polyme ngay trong quá trình polyme hóa, trong sáng chế này chúng tôi sử dụng: (i) Hạt keo Au có kích thước 10 nm đã gắn các monome p-ATP hoặc (ii) hợp chất HAuCl_4 được đưa thêm vào trong dung dịch polyme theo tỷ lệ tương ứng 1:3 (hạt keo Au:p-ATP) và 0,01:5 (HAuCl_4 :p-ATP).

Hỗn hợp dung dịch polyme được pha trong dung dịch đệm PBS 100 mM. 35 μL dung dịch này được nhỏ lên điện cực (bao trùm cả điện cực làm việc,

điện cực đối và điện cực chuẩn Ag/AgCl). Sau đó tiến hành polyme hóa bằng phương pháp quét thể tuần hoàn trong dải điện áp từ -200 mV đến 600 mV vs. Ag/AgCl với số vòng quét từ 15 đến 20 vòng.

Bước 5: Tách bỏ phân tử chất phân tích khỏi màng poly(aminothiophenol) bằng lực tĩnh điện thông qua áp thế tĩnh điện trong môi trường axit

Nhỏ 35 μ L dung dịch HCl 1 M lên điện cực và tiến hành áp thế tĩnh 600 mV vs. Ag/AgCl với thời gian 600 s. Ở bước công nghệ này, điện áp một chiều phá vỡ liên kết hydro giữa phân tử chất in (chất phân tích) được proton hóa với màng polyme và loại bỏ chúng ra khỏi màng. Khi các phân tử chất in rời đi, để lại trên màng polyme những hốc nhận diện đặc hiệu về hình dạng, kích thước và có các gốc liên kết với phân tử in.

Đối với trường hợp chất phân tích là kháng nguyên thì ở bước 2 sẽ gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu của kháng nguyên đó. Tiếp theo, gắn kháng nguyên đặc hiệu thông qua liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể bằng cách nhỏ 2 μ L kháng nguyên lên điện cực có gắn kháng thể và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 h. Cuối cùng polyme hóa tạo màng polyme MIP và tách bỏ kháng nguyên khỏi màng polyme theo bước 4 và 5 của quy trình trên.

Phần tiếp theo sẽ giải thích nguyên lý hoạt động của cảm biến điện hóa phổ tổng trở faradaic (EIS) sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP.

Trong cảm biến sinh học điện hóa EIS sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP, khi phân tử chất phân tích tái liên kết với bề mặt điện cực có gắn các đầu thu sinh học nhân tạo MIP sẽ làm thay đổi hình thái bề mặt điện cực cảm biến và do đó làm thay đổi tín hiệu trở kháng của hệ cảm biến. 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 O.C.P 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 khớp phổ EIS. Trong đó, hai đại lượng R_s và Z_w đặc trưng cho các

tính chất của dung dịch điện phân 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 tử 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 Zre 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 chất phân tích tái liên kết với bề mặt điện cực cảm biến.

Tiếp theo, đầu thu sinh học MIP trên nền điện cực AuNPs/SPCE sẽ được ứng dụng thử nghiệm trong một quy trình phân tích mẫu. Cụ thể, quy trình phân tích mẫu bằng cảm biến điện hóa EIS sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP bao gồm các công đoạn sau.

Xây dựng đường chuẩn của cảm biến

Bước 1: Nhỏ 2 μ L dung dịch chất 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 μ L dung dịch gồm có 0,1 M KCl và 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 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 (fit) 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 gắn các đầu thu sinh học nhân tạo MIP. 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 (fit) phổ tổng trở bằng mạch tương đương Randles, xác định giá R_{CT} . Chiếu giá trị này lên đường chuẩn của cảm biến để xác định nồng độ chất phân tích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

- a) Chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP ứng dụng phát hiện kháng sinh nhóm Quinolone Norfloxacin (NOR)
 - Thực hiện các bước từ 1 đến 5 của quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP như mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”. Hình thái bề mặt của điện cực sau mỗi bước chế tạo được khảo sát bằng phương pháp chụp ảnh SEM trình bày trên hình 4.
 - Phổ EIS của cảm biến xác định kháng sinh nhóm Quinolone Norfloxacin (NOR) sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP khi không trộn hạt Au (cảm biến 1), khi trộn hạt keo vàng kích thước 10 nm (cảm biến 2) và có HAuCl_4 trong dung dịch polyme (cảm biến 3) lần lượt trình bày trên hình 5a, 5b và 5c khi NOR (với các nồng độ xác định từ 1 nM đến 80 nM) tái liên kết với đầu thu sinh học NOR-MIP. 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 NOR. Sự tăng này được giải thích là do quá trình tái liên kết giữa các phân tử NOR với đầu thu NOR-MIP đặc hiệu của chúng, tạo ra một lớp điện môi mỏng ngăn cản quá trình truyền điện tử đến điện cực. Tuy nhiên, có thể thấy đường đặc trưng EIS của ba loại cảm biến trên có sự khác biệt rõ rệt. Đường kính bán cung của cảm biến NOR-MIP pha tạp hạt vàng lớn hơn nhiều so với cảm biến không pha tạp hạt vàng. Giá trị R_{CT} được xác định thông qua fit phổ EIS sử dụng mạch tương đương Randles. Chúng tôi tiến hành vẽ đường đặc trưng chuẩn thể hiện sự phụ thuộc của ΔR_{CT} (sự thay đổi giá trị R_{CT} của cảm biến tại nồng độ NOR xác định so với mẫu trắng) vào nồng độ NOR. Trên hình 5d trình bày đường đặc trưng của ba loại cảm biến trên. Cảm biến có pha tạp hạt keo Au vào màng polyme có độ dốc cao hơn so với cảm biến còn lại khi mà sự thay đổi nồng độ NOR là như nhau. Điều này chứng tỏ cảm biến khi có pha tạp thêm hạt keo nano Au vào quá trình polyme đã làm tăng đáng kể độ nhạy của cảm biến. Tiến hành fit tuyến tính đường đặc trưng chuẩn xác định được giới hạn phát hiện (LOD) của cảm biến 2 có giá trị tốt nhất (0,21 nM trong dải nồng độ từ 0 đến 10 nM và 2,44 nM trong dải nồng độ từ 10 đến 80 nM). Để nghiên cứu đặc tính chọn lọc của cảm biến, ba chất kháng sinh bao gồm Levofloxacin, Ciprofloxacin (có cấu trúc hóa học gần như tương tự phân tử NOR) và Chloramphenicol (có cấu trúc hoá học khác hoàn toàn với NOR) đã được trộn cùng với NOR ở cùng nồng độ (10 nM, 60 và 80 nM). Hình 5e và 5f trình bày giá trị ΔR_{CT} thu được lần lượt khi cho cảm biến 2 tiếp xúc với dung dịch chứa kháng sinh khác và hỗn hợp kháng sinh khác với kháng sinh NOR. Kết quả cho thấy tín hiệu thu được của cảm biến không thay đổi nhiều so với tín hiệu đo được trong dung dịch chỉ có duy nhất kháng sinh NOR. Như vậy có thể thấy tín hiệu thu được của cảm biến chính là sự tái liên kết của các phân tử chất phân tích NOR với khuôn mẫu của chính nó, cảm biến đã chế tạo có độ chọn lọc cao.

- Cảm biến dựa trên công nghệ MIP kết hợp với phương pháp EIS đã cho thấy khả năng ứng dụng phát hiện các phân tử kích thước nhỏ với độ chọn lọc cao. Thêm vào đó, quy trình chế tạo cảm biến có ưu điểm về chi phí sản xuất (điện cực giá rẻ SPCE nhưng có thể sử dụng như điện cực in vàng), phương pháp đo lường đơn giản, nhanh chóng và độ lặp lại tốt.
- Phép đo quang phổ Raman được thực hiện sau mỗi bước chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP nhằm xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của phân tử in trong mạng polyme. Kỹ thuật này 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 nồng độ chất. Trên hình 6 trình bày phổ Raman sau mỗi bước công nghệ chế tạo đầu thu sinh học NOR-MIP cũng như sự tái liên kết của các phân tử NOR với đầu thu đặc hiệu MIP của nó. Đặc trưng phổ Raman ghi nhận sự xuất hiện của các phân tử NOR trong mạng polyme tại các tần số dao động đặc trưng liệt kê chi tiết trong bảng 1. Sau bước 5 (tách loại bỏ các phân tử chất phân tích ra khỏi mạng polyme), tất cả các pic đặc trưng của phân tử NOR không xuất hiện trong phổ Raman. Điều này chứng tỏ các phân tử NOR đã được loại bỏ khỏi mạng polyme bằng phương pháp áp thế một chiều trong dung dịch HCl 1M. Khi cho điện cực có gắn các đầu thu sinh học nhân tạo NOR-MIP tiếp xúc với dung dịch có chứa phân tử NOR, trên phổ Raman xuất hiện trở lại các pic đặc trưng của phân tử NOR. Điều này chứng tỏ đã xảy ra hiện tượng tái liên kết các phân tử NOR trong dung dịch với các đầu thu sinh học nhân tạo NOR-MIP trên bề mặt điện cực cảm biến.

Chất	Nhóm chức	Tần số dao động (cm ⁻¹)
Cacbon	C-C	1337,1579
Poly(aminothiophenol)	Dao động của nhóm C-S	1081
	Uốn cong liên kết C-H	1143
	Uốn cong liên kết C-H	1181
	Uốn cong liên kết C-H, dao động của nhóm C-C	1403
Phân tử Norfloxacin	Sự dao động của nhóm liên kết no C-C, dao động của nhóm C-N.	485
	Dao động đối xứng của nhóm C-F	872
	Dao động của nhóm O-C-O và sự biến dạng nhóm methylene do ảnh hưởng từ nhóm piperazinyll	1418
	Dao động mạnh của nhóm C=O và sự kéo dẫn gốc N ⁺ H ₂ của gốc piperazinyll	1655

Bảng 1

b) Chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP ứng dụng phát hiện kháng nguyên Enrofloxacin

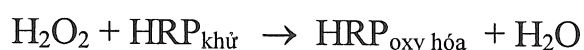
- Thực hiện các bước của quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP với chất phân tích là kháng nguyên, sử dụng liên kết đặc hiệu giữa kháng thể và kháng nguyên như mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”.
- Đặc trưng phổ tổng trở EIS và đồ thị đường chuẩn của cảm biến phát hiện kháng nguyên Enrofloxacin sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên (cảm biến 1) và đầu thu sinh học nhân tạo MIP (cảm biến 2) tại các nồng độ kháng nguyên khác nhau được trình bày trên hình 7. Cả hai cảm biến hoạt động tốt trong dải nồng độ kháng nguyên từ 0 đến 10 ng/mL. Tuy nhiên, cảm biến sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP cho độ nhạy cao hơn so với sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên (đánh giá qua R² và *slope* của đường đặc trưng chuẩn).

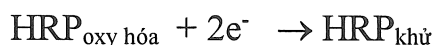
- Phép đo quang phổ Raman cũng được thực hiện sau mỗi bước chế tạo cảm biến sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên và đầu thu sinh học nhân tạo MIP. Trên hình 8 trình bày đặc trưng quang phổ Raman sau mỗi bước chế tạo hai loại cảm biến kể trên. Với cảm biến 1, khi cố định kháng thể (mouse anti-Enrofloxacin monoclonal antibody), trên đặc trưng quang phổ Raman xuất hiện các pic đặc trưng được liệt kê chi tiết trong bảng 2. Tiếp theo, khi cho điện cực có gắn kháng thể vào môi trường có chứa kháng nguyên đặc hiệu của nó (Enrofloxacin-BSA conjugate), trên quang phổ Raman xuất hiện thêm các pic đặc trưng của kháng nguyên (xem bảng 2). Điều này chứng tỏ trên bề mặt điện cực xảy ra tương tác liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Sau bước polyme in kháng nguyên vào mạng polyme, đặc trưng quang phổ Raman ghi nhận thêm các pic đặc trưng của màng poly(aminothiophenol) bên cạnh các pic đặc trưng của kháng thể và kháng nguyên. Sau bước 5 (tách loại bỏ các phân tử chất phân tích ra khỏi mạng polyme), tất cả các pic đặc trưng của kháng nguyên Enrofloxacin không xuất hiện trong đặc trưng quang phổ Raman. Điều này chứng tỏ kháng nguyên đã được loại bỏ khỏi mạng polyme bằng phương pháp áp thế một chiều trong dung dịch HCl 1M. Khi cho điện cực có gắn các đầu thu sinh học nhân tạo kháng nguyên-MIP tiếp xúc với dung dịch có chứa kháng nguyên, trên phổ Raman xuất hiện trở lại các pic đặc trưng của kháng nguyên. Điều này chứng tỏ đã xảy ra hiện tượng tái liên kết kháng nguyên trong dung dịch với các đầu thu sinh học nhân tạo kháng nguyên-MIP trên bề mặt điện cực cảm biến.

Chất	Nhóm chức	Tần số dao động (cm ⁻¹)
Carbon	C-C	1337
	C-C	1579
Dao động của liên kết C-S và liên kết C-C		1081
Poly(Aminothiophenol)	Dao động của liên kết C-N và dao động uốn cong trong liên kết C-H	1143
		1181
Kháng thể ENRO	Amide III	1272
	Amide III	1349
	Dao động uốn cong của C-H ₂	1428
Kháng nguyên ENRO	Dao động uốn cong của C-H	1235
	Dao động của liên kết O-C-O	1388
	Kháng nguyên ENRO-MIP	1481

Bảng 2

- c) Chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo enzyme HRP-MIP ứng dụng phát hiện H₂O₂
- Thực hiện các bước của quy trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP với chất phân tích là enzyme HRP (horseradish peroxidase) như mô tả trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế”.
 - Enzyme HRP là một glycoprotein được chiết ra từ rễ cây cải ngựa và phản ứng đặc hiệu với chất oxi hóa như H₂O₂ và các peroxide có chứa gốc methyl và ethyl. Trên hình 9a trình bày đặc trưng dòng - thế của cảm biến sử dụng đầu thu sinh học tự nhiên enzyme HRP trong dung dịch PBS 100 mM (pH 6,0) có H₂O₂ với các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 1 mM). Trên đặc trưng dòng - thế chỉ xuất hiện pic khử tại điện áp -0,42 V vs. Ag/AgCl khi cảm biến tiếp xúc với môi trường dung dịch có chứa H₂O₂ và cường độ dòng khử tăng theo nồng độ H₂O₂. Kết quả này chứng tỏ đã xảy ra phản ứng xúc tác đặc trưng của enzyme HRP khử H₂O₂. Quá trình này tuân theo phương trình phản ứng sau:





- Trên hình 9b trình bày đặc trưng dòng - thế của cảm biến sử dụng đầu thu nhân tạo HRP-MIP ghi nhận trong đệm PBS 100 mM (pH 6,0) có chứa 1 mM H₂O₂ trước và sau khi tiếp xúc với enzyme HRP tại các nồng độ lần lượt là 1, 10 và 100 ng/mL. Kết quả cho thấy, trên đặc trưng dòng - thế chỉ xuất hiện píc khử tại -0,42 V vs. Ag/AgCl sau khi cho cảm biến tiếp xúc với enzyme HRP và cường độ píc này đạt giá trị cao nhất tại nồng độ enzyme HRP là 100 ng/mL và giảm khi nồng độ enzyme HRP giảm. Điều này chứng tỏ đã xảy ra phản ứng tái liên kết của enzyme HRP với đầu thu sinh học nhân tạo HRP-MIP của nó.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

- Lớp hạt nano Au phân tán trên bề mặt điện cực mực in cacbon đã làm tăng hiệu suất chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP cũng như các đầu thu sinh học này định xứ ngay tại bề mặt màng polyme nên các phân tử chất phân tích dễ tiếp cận đến để tái liên kết với các đầu thu sinh học của chúng.
- Hạt nano Au được đưa vào màng polyme trong quá trình chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo MIP đã làm tăng độ nhạy của cảm biến do làm tăng cường quá trình vận chuyển điện tử trong mạng lưới polyme.

Theo quy trình chế tạo cảm biến sinh học của sáng chế, có thể phát triển được cảm biến sinh học sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo MIP ứng dụng trong vệ sinh an toàn thực phẩm và chẩn đoán bệnh sớm.

Phần 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 chế tạo đầu thu sinh học nhân tạo sử dụng công nghệ polyme in phân tử (MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán bệnh sớm, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) phủ lớp hạt nano vàng (AuNPs) phân tán trên bề mặt điện cực mực in cacbon SPCE theo phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn;
- (ii) tạo lớp màng đơn lớp tự lắp ghép (SAM) của monome p-aminothiophenol (p-ATP) trên điện cực AuNPs/SPCE bằng phương pháp nhúng phủ;
- (iii) gắn các phân tử chất cần phân tích lên màng SAM của p-ATP trên điện cực AuNPs/SPCE bằng lực tĩnh điện thông qua áp thế tĩnh điện một chiều;
- (iv) in phân tử chất cần phân tích vào màng polyme của p-ATP (tổng hợp màng polyme MIP) có pha tạp hạt Au bằng cách ngâm điện cực AuNPs/SPCE có màng SAM của p-ATP được gắn các phân tử chất cần phân tích trong dung dịch polyme gồm monome p-ATP và phân tử chất cần phân tích, trong đó:
 - dung dịch này được thêm vào một lượng dung dịch HAuCl_4 , sau đó tiến hành polyme hóa bằng phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn với điện áp được quét từ -650 mV đến +600 mV so với điện cực chuẩn Ag/AgCl, hoặc
 - dung dịch này được thêm vào một lượng hạt keo Au đã gắn các monome p-ATP, sau đó tiến hành polyme hóa bằng phương pháp điện hóa quét thế tuần hoàn với điện áp được quét từ -200 mV đến +600 mV so với điện cực chuẩn Ag/AgCl;
- (v) tách bỏ chất cần phân tích khỏi màng polyme aminothiophenol bằng lực tĩnh điện thông qua áp thế tĩnh điện trong môi trường axit, điện thế một chiều này sẽ phá vỡ liên kết hydro giữa phân tử chất in được proton hóa với màng polyme và loại bỏ chúng ra khỏi màng;

- (vi) tín hiệu hoạt động của cảm biến trong phát hiện phân tích được ghi nhận thông qua việc đo phổ tổng trở faradaic; và trong quy trình chế tạo
- (vii) phân tích bổ trợ các tính chất của điện cực cảm biến sau mỗi bước công nghệ bằng phương pháp đo phổ Raman và đo đặc trưng dòng - thế.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó, ở bước in phân tử chất cần phân tích vào màng polyme của p-ATP có pha tạp AuNPs bằng phương pháp điện hóa quét thế vòng tuần hoàn, AuNPs được đưa vào màng polyme ngay trong quá trình polyme tạo MIP dưới dạng hạt keo vàng có kích thước 10 nm đã gắn các monome p-ATP.

3. Quy trình theo các điểm 1, trong đó bước phủ lớp hạt nano vàng (AuNPs) phân tán trên bề mặt điện cực còn bao gồm bước quét điện cực AuNPs/SPCE trong dung dịch H_2SO_4 nồng độ 1 M với điện thế từ -0,2 V đến +1,4 V so với điện cực chuẩn Ag/AgCl, tốc độ quét là 50 mV/s cho đến khi thu được đáp ứng điện hóa ổn định.

4. Quy trình theo một trong số các điểm 1 - 3, trong đó ở bước tạo lớp màng đơn lớp tự lắp ghép (SAM) của monome p-aminothiophenol (p-ATP) trên điện cực AuNPs/SPCE, điện cực AuNPs/SPCE được ngâm trong dung dịch ethanol có chứa monome p-ATP nồng độ 50 mM trong buồng tối ở nhiệt độ phòng trong khoảng 15 giờ.

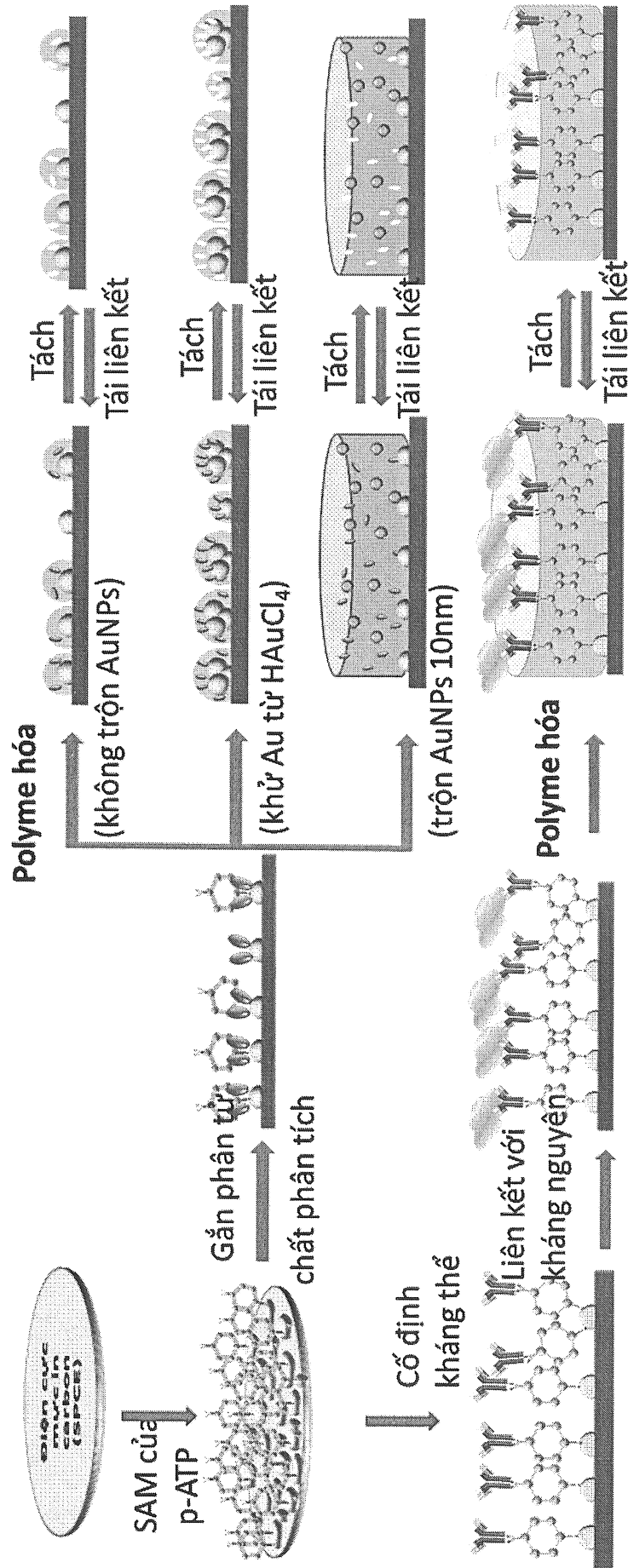
5. Quy trình theo một trong số các điểm 1 - 4, trong đó ở bước gắn các phân tử chất cần phân tích lên màng SAM p-ATP trên điện cực AuNPs/SPCE, phân tử cần phân tích được hòa tan trong môi trường dung môi để có được nồng độ 10 mM, sau đó nhỏ 35 μL dung dịch này lên điện cực p-ATP/AuNPs/SPCE và tiến hành áp thế tĩnh -600 mV vs. Ag/AgCl trong 600 s.

6. Quy trình theo một trong số các điểm 1 - 5, trong đó, trong trường hợp chất phân tích là kháng nguyên thì trong bước (ii) sẽ gắn kháng thể đơn dòng đặc

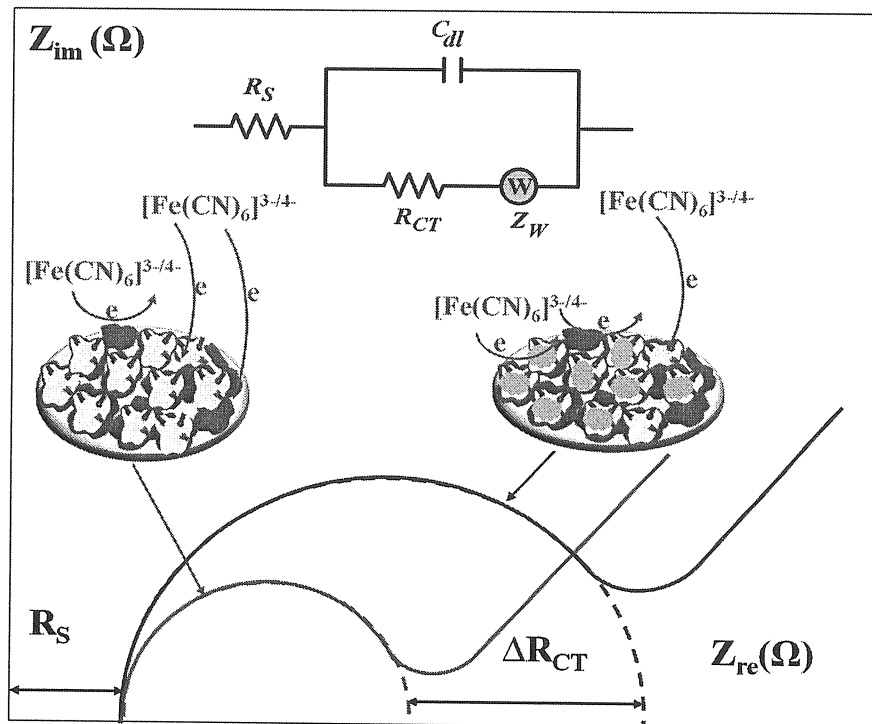
hiệu của kháng nguyên đó, tiếp theo, gắn kháng nguyên đặc hiệu thông qua liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, và cuối cùng polyme hóa tạo màng polyme MIP và tách bỏ kháng nguyên khỏi màng polyme theo các bước (iv) và (v) của quy trình này.

7. Đầu thu sinh học nhân tạo sử dụng công nghệ polyme in phân tử (MIP) ứng dụng chế tạo cảm biến sinh học trong an toàn thực phẩm và chẩn đoán bệnh sớm được chế tạo bởi quy trình theo một trong số các điểm 1 – 6.

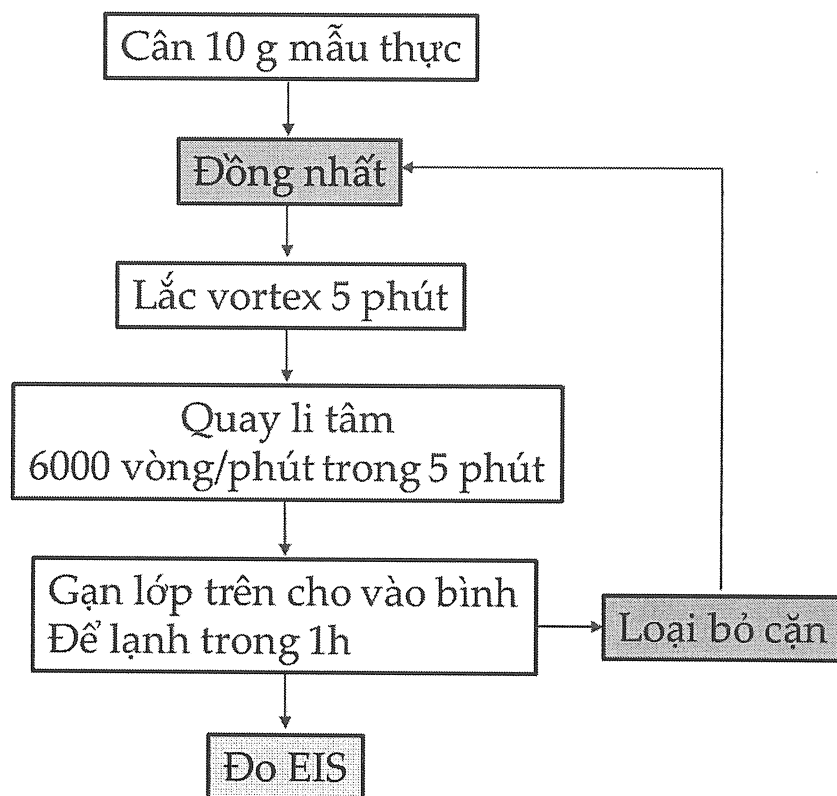
8. Cảm biến sinh học sử dụng đầu thu sinh học nhân tạo sử dụng công nghệ polyme in phân tử (MIP) theo điểm 7.



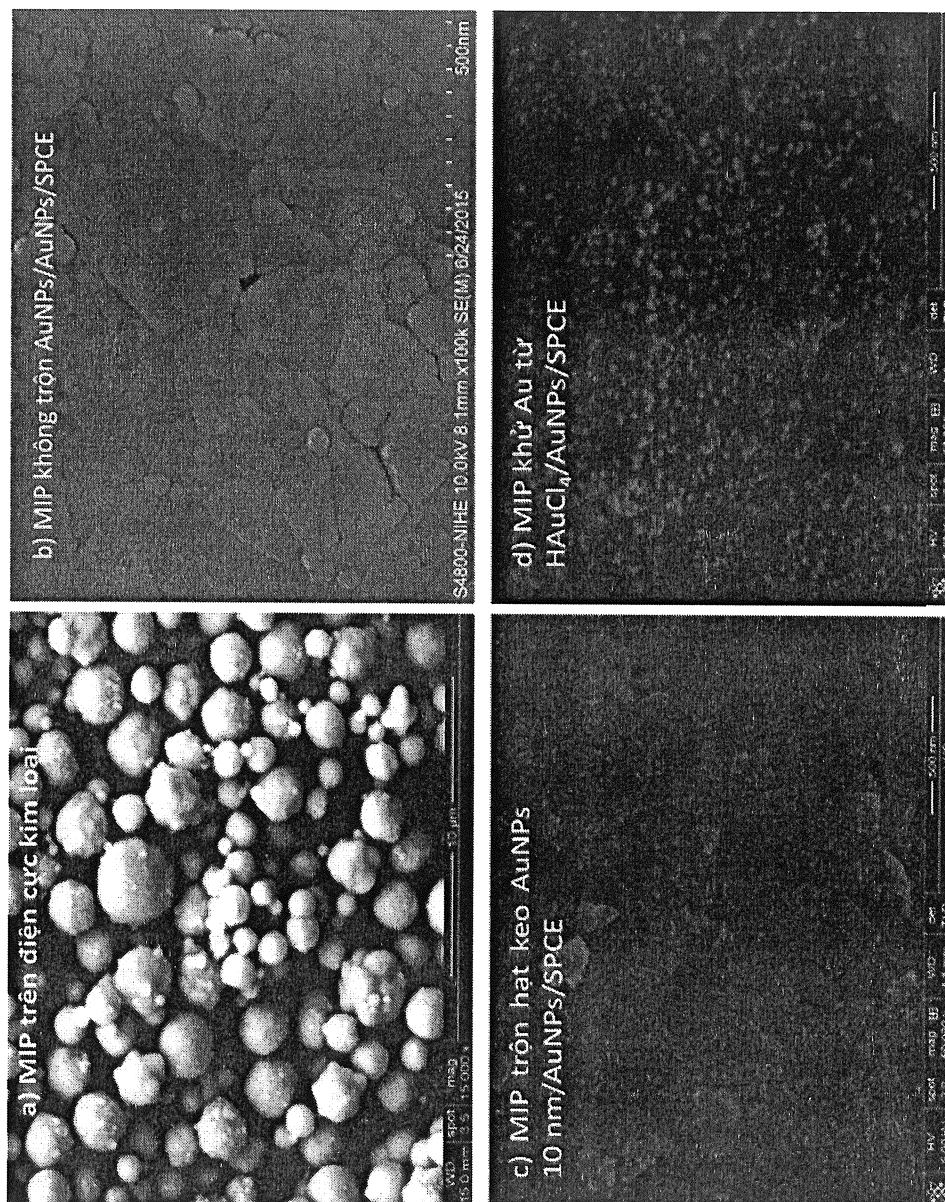
Hình 1



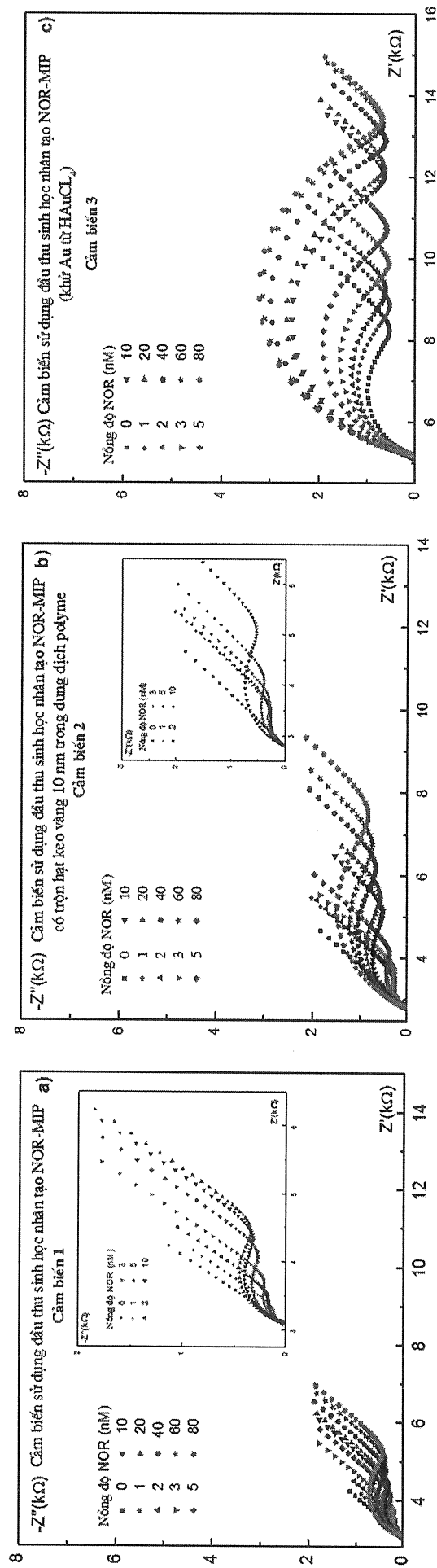
Hình 2



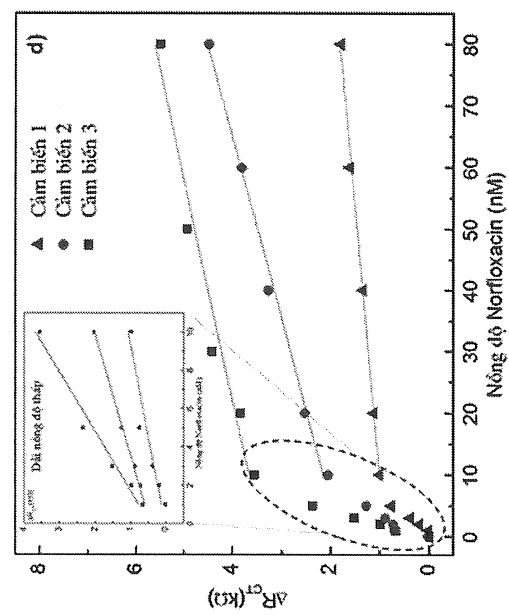
Hình 3



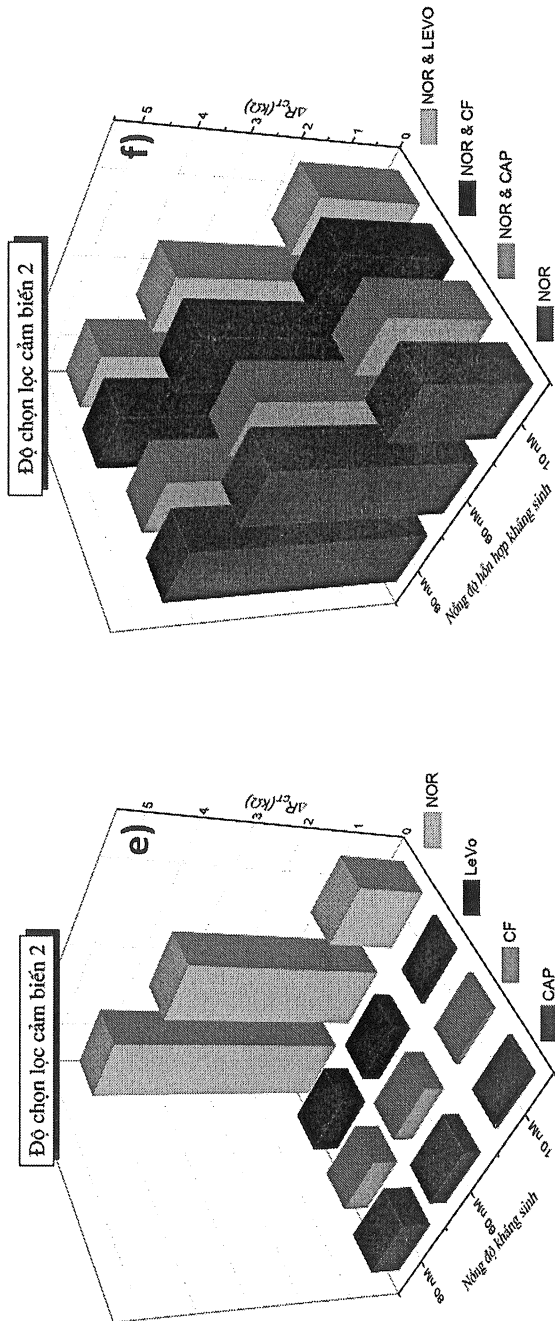
Hình 4



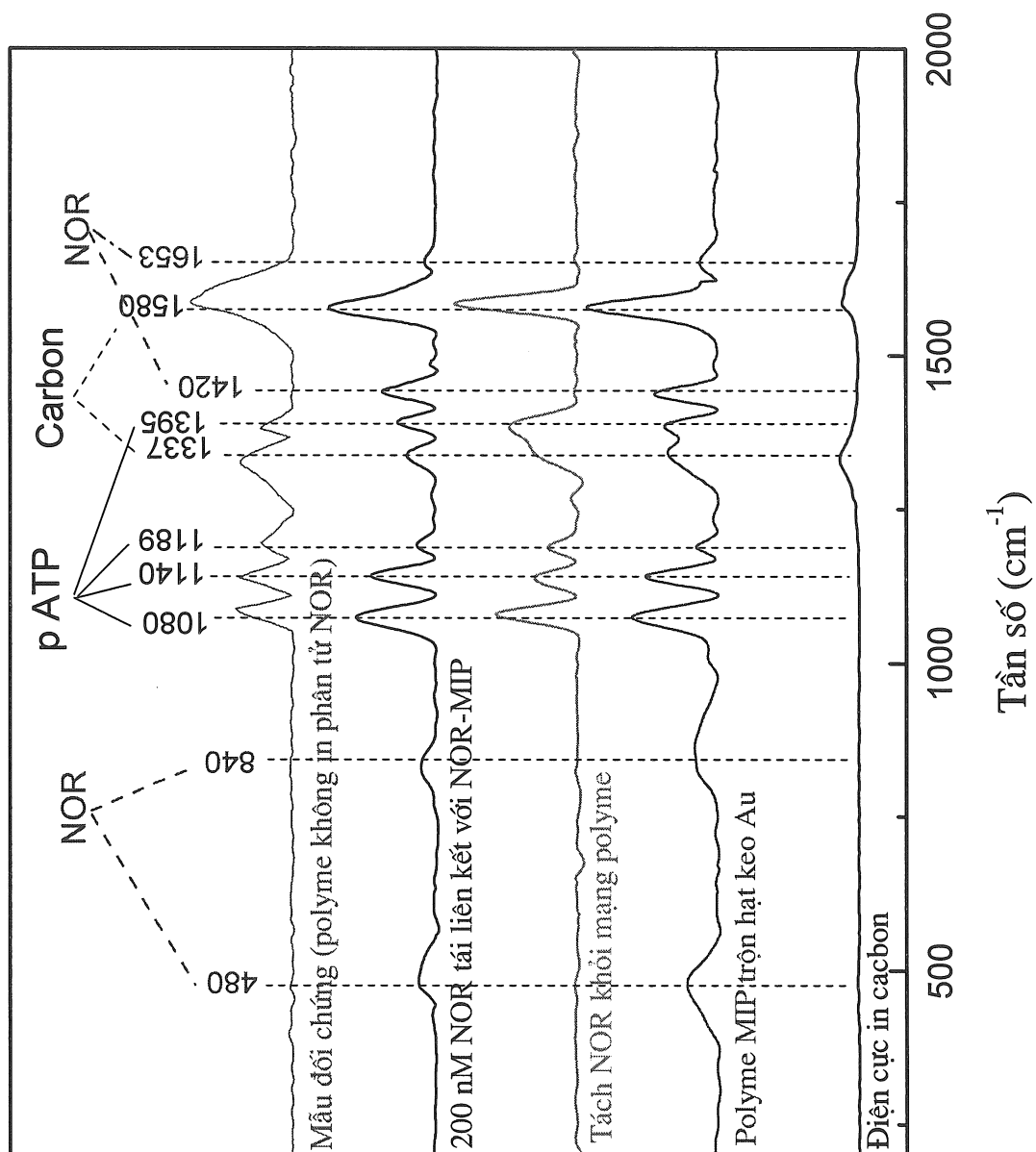
Hình 5 (còn tiếp)



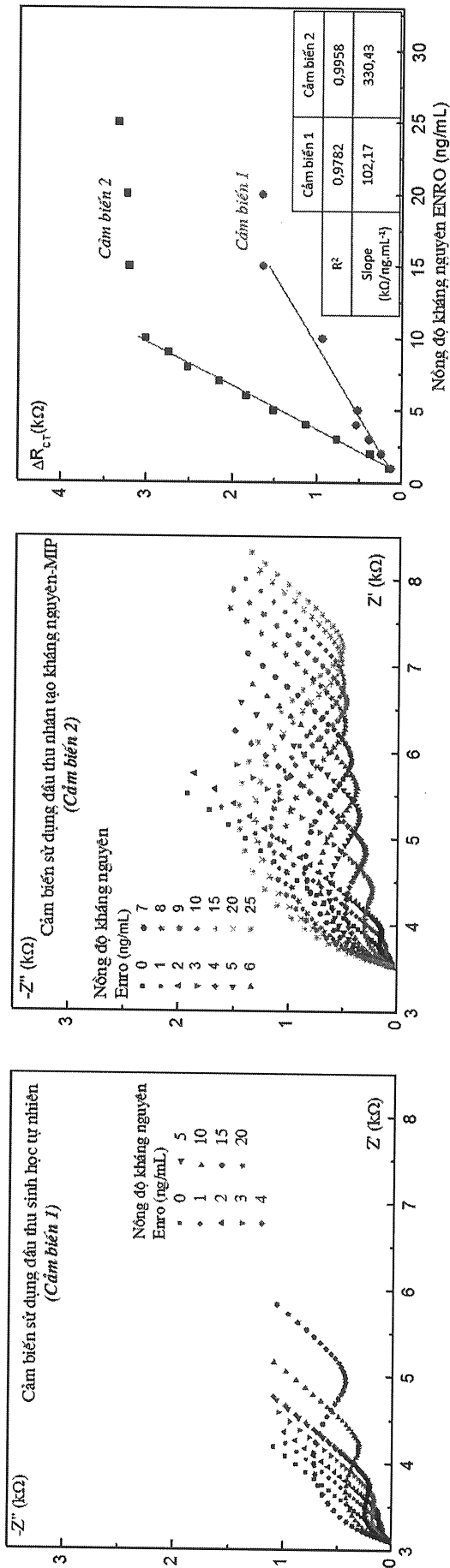
	Dải nồng độ NOR (1-10 nM)			Dải nồng độ NOR (10-80 nM)		
	R^2	Slope (Ω/nM)	LOD (nM)	R^2	Slope (Ω/nM)	LOD (nM)
Cảm biến 1	0,96	322,83	0,21	0,94	27,97	2,44
Cảm biến 2	0,98	159,44	0,02	0,99	33,99	0,10
Cảm biến 3	0,86	106,82	8,37	0,99	11,74	75,9



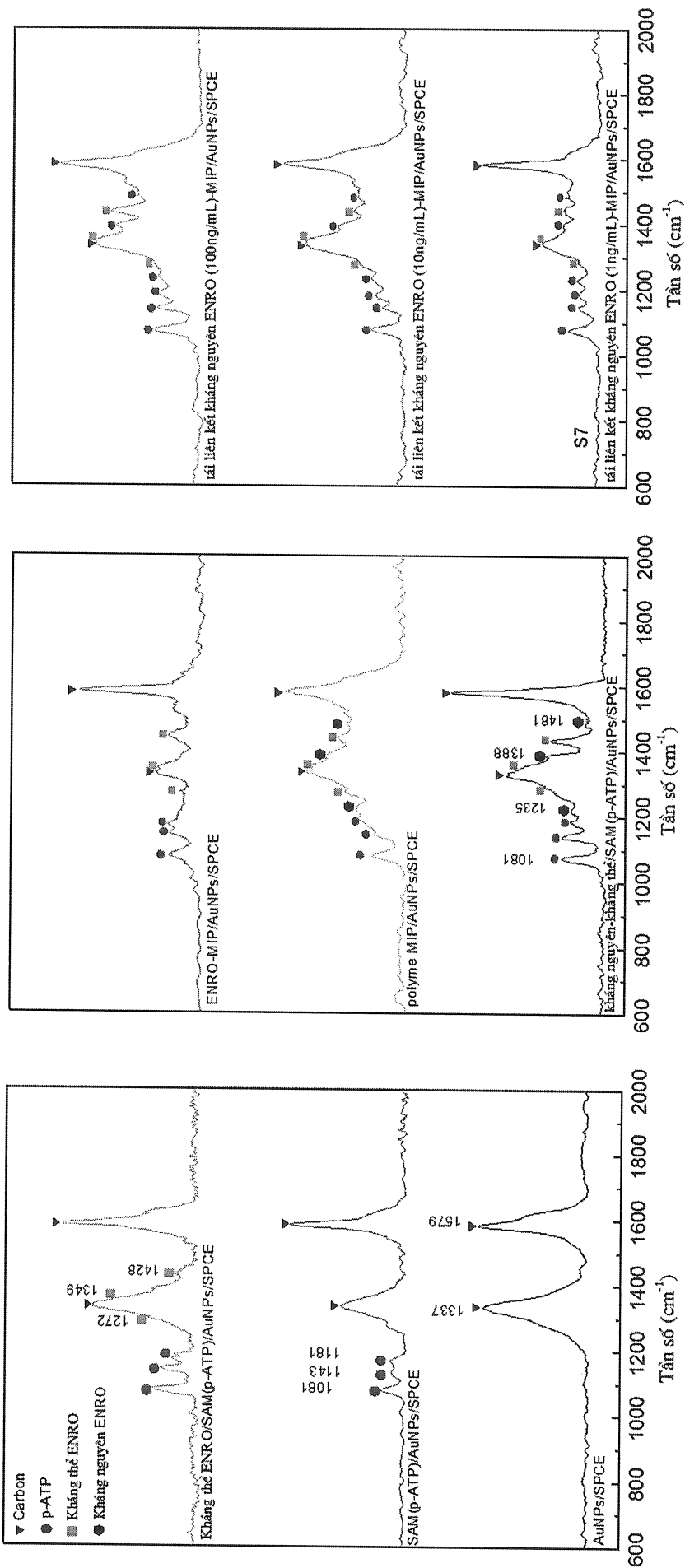
Hình 5 (tiếp theo)



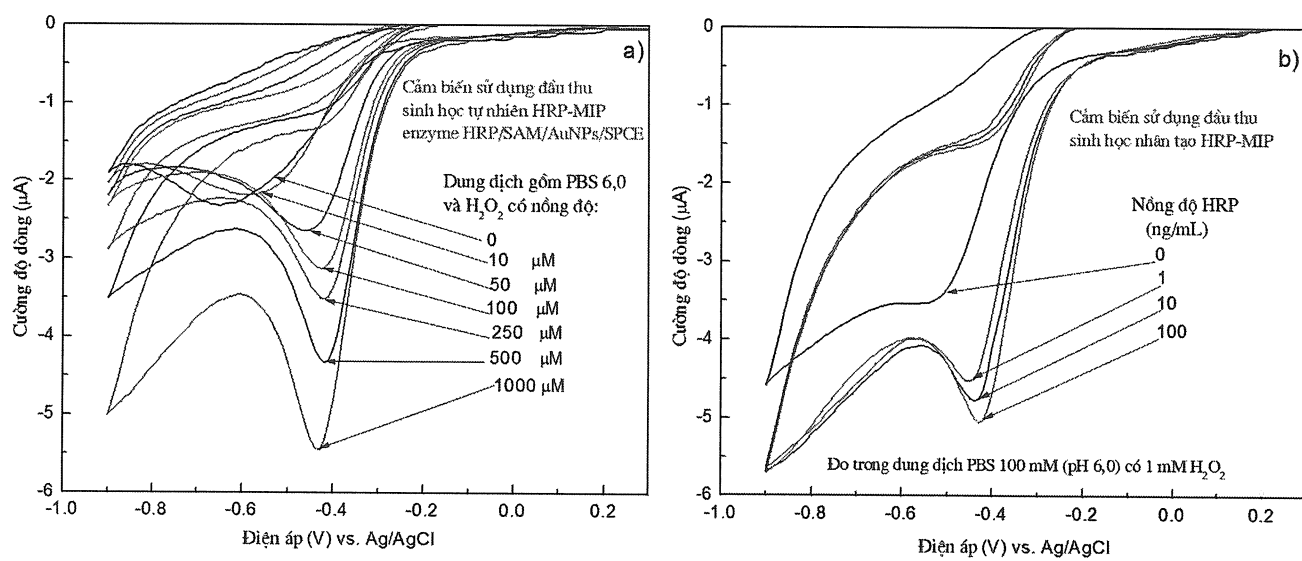
Hình 6



Hình 7



Hình 8



Hình 9