



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



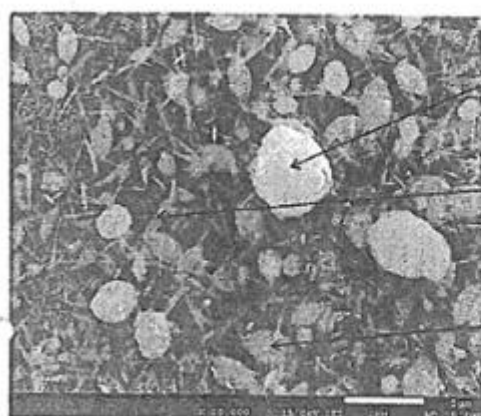
1-0025792

(51)⁷ G01N 21/65; G01N 33/68; G01N 33/543 (13) B

- (21) 1-2015-04571 (22) 08/05/2014
(86) PCT/JP2014/062318 08/05/2014 (87) WO2014/181816 13/11/2014
(30) 2013-098608 08/05/2013 JP
(45) 26/10/2020 391 (43) 25/02/2016 335A
(73) 1. MYTECH CO., LTD. (JP)
4652-4, Funatsu-cho, Himeji-shi, Hyogo 6792101, Japan
2. ITO, Hiroaki (JP)
11-6-3001, Tukuda 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 1040051, Japan
(72) ITO, Hiroaki (JP); HASEGAWA, Yuki (JP); HASEGAWA, Katsuyuki (JP).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHIP SINH HỌC ĐỀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH UNG THƯ VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHIP SINH HỌC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chip sinh học để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư bao gồm vùng tinh thể meso trong đó bạc oxit chứa bạc peroxit được tự lắp ráp thành siêu cấu trúc không gian ba chiều dạng sợi, có khả năng tích điện âm trong mẫu sinh học và còn có hiện tượng cộng hưởng tăng cường bề mặt bằng cách chiếu ánh sáng kích thích; và phương pháp sản xuất chip sinh học này.



Khối tinh thể kích cỡ lớn

Tinh thể hình kim

Khối hình bầu dục

Đo tại Trung tâm Công nghệ Hyogo

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chip sinh học để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư có nồng độ tăng trong máu theo tiến triển của bệnh ung thư, bao gồm ADN tự do (ADN cuốn quanh histon) bằng phổ tán xạ Raman và phương pháp sản xuất chip sinh học này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phương pháp định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư có nồng độ tăng trong máu theo tiến triển của bệnh ung thư là một trong các phương pháp vẫn được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư. Hợp chất liên quan đến bệnh ung thư là protein và các hợp chất tương tự, có tính đặc trưng cho bệnh ung thư, được tách chiết từ dịch thể của người bị bệnh ung thư và thường được tiết vào máu khi tế bào ung thư bị tiêu diệt. Theo các phương pháp đã biết, người bệnh hoặc đối tượng xét nghiệm có thể được chẩn đoán là bị bệnh ung thư khi nồng độ hợp chất liên quan đến bệnh ung thư phát hiện được trong máu cao hơn ngưỡng xác định.

Do đó, đã biết rằng khi hợp chất liên quan đến bệnh ung thư được tiết vào máu khi tế bào ung thư bị phá hủy thì không chỉ protein mà cả ADN cũng có thể được tiết vào máu. Khi so sánh người bị bệnh ung thư với người khỏe mạnh thì đã ghi nhận được rằng lượng ADN tự do (ctADN) có nguồn gốc từ tế bào ung thư trong máu ở người bị bệnh ung thư là cao hơn đáng kể so với ở người khỏe mạnh. Do đó, bằng cách định lượng ADN tự do trong tế bào ung thư thu được từ dịch thể như máu người ta cho rằng có thể chẩn đoán được bệnh ung thư. Ví dụ về các phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư đã biết bao gồm: 1) phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư khi phát hiện được AND có chiều dài bằng 200bp hoặc cao hơn trong dịch thể hoặc phân lấy từ cơ thể để khuếch đại bằng phương pháp PCR và các phương pháp tương tự, và tiếp đó phân tích đột biến ADN của nó, khi cần (Tài liệu sáng chế 1 và 2) và 2) phương pháp định lượng ADN bộ gen chứa trong dịch thể, và tiếp đó giải trình tự ADN khi lượng ADN bộ gen thu được cao hơn ngưỡng xác định (Tài liệu sáng chế 3).

Ngạc nhiên là ngay cả khi người bệnh được chẩn đoán bị bệnh ung thư, thì việc phân tích định lượng ADN trong dịch thể cũng không thể xác định được cơ quan bị ung thư. Đã biết rằng khi bệnh ung thư bùng phát và tiến triển thì đột biến đặc trưng của ADN sẽ xuất hiện phụ thuộc vào vị trí phát sinh ung thư. Do đó, bằng cách xác định loại đột biến của ADN thì có thể xác định được cơ quan hoặc vị trí bị ung thư khi bệnh ung thư phát triển. Theo sáng chế, khi ADN bị đột biến thì đột biến điểm ADN và cả các đột biến bất thường về cấu trúc như đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể có thể tăng hoặc giảm. Ví dụ, đã biết rằng đột biến điểm của gen K-ras xuất hiện ở khoảng 70% người bị bệnh ung thư tuyến tụy. Ngoài ra, phân tích đột biến mất dị hợp tử (loss of heterozygous - LOH) đã ghi nhận được đột biến mất đoạn nhiễm sắc thể đặc trưng phụ thuộc vào từng loại bệnh ung thư, ví dụ đã biết rằng ở người bị bệnh ung thư phổi, đột biến mất dị hợp tử xuất hiện chủ yếu ở đoạn mạch ngắn của nhiễm sắc thể 3. Ngoài ra, ở người bị bệnh ung thư vú cũng xuất hiện đột biến khuếch đại đoạn mạch dài số 8 của nhiễm sắc thể và đột biến khuếch đại RB2. Do đó, để chẩn đoán chính xác hơn bệnh ung thư bằng cách định lượng ADN tự do từ tế bào ung thư, đã có phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư bao gồm các bước: chiết tách ADN tự do từ huyết tương của đối tượng cần chẩn đoán; tính toán lượng ADN tự do tính trên đơn vị thể tích huyết tương chiết tách được bằng cách định lượng ADN tự do; so sánh lượng ADN tự do tính toán được với ngưỡng thứ hai cao hơn ngưỡng thứ nhất; và chẩn đoán theo tiêu chuẩn sau: đối tượng có khả năng bị bệnh ung thư cao khi lượng ADN tự do tính toán được nhỏ hơn ngưỡng thứ nhất, trong khi đó một số ADN từ tế bào bình thường bị lẫn trong huyết tương khi ngưỡng nêu trên cao hơn ngưỡng thứ hai (Tài liệu sáng chế 4).

Tuy nhiên, ngay cả khi cố gắng định lượng ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư trong máu toàn phần, thì trong đó ADN tự do chỉ có mặt lượng vết ADN tự do, còn lượng lớn ADN lại có nguồn gốc đến lympho bào bình thường. Do đó, ngay cả khi chiết tách trực tiếp ADN từ máu toàn phần thì cũng khó định lượng chính xác được lượng ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư. Còn khi sử dụng huyết tương đã tách ra khỏi máu toàn phần, có thể định lượng được ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư trong huyết tương, tuy nhiên phụ thuộc vào phương pháp chiết tách ADN, ADN có nguồn gốc từ tế bào bình thường như lympho bào cũng có thể lẫn vào ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư, do đó cả ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư lẫn ADN có nguồn gốc từ tế bào bình thường đều được định lượng, dẫn đến chẩn đoán sai bệnh ung thư. Do đó,

để chẩn đoán chính xác bệnh ung thư, quan trọng là định lượng chính xác ADN tự do (cũng được gọi là ADN cuộn quanh histon theo sáng chế) có nguồn gốc từ tế bào ung thư, và do vậy cần có phương pháp đơn giản và nhanh chóng để chiết tách ADN tự do và phương pháp loại ADN có nguồn gốc từ tế bào bình thường để cải thiện độ chính xác của phương pháp phát hiện ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư, và phương pháp phát hiện chính xác lượng vết của ADN để chẩn đoán hiệu quả bệnh ung thư.

Gần đây, phổ Raman đã được sử dụng để định lượng lượng vết ADN trong máu, và có triển vọng là phương pháp phát hiện và định lượng chính xác, tuy nhiên phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (Surface Enhanced Raman Scattering - SERS) vẫn còn tồn tại nhiều vấn đề cần giải quyết bao gồm 1) cơ chế chưa được biết rõ hoàn toàn, 2) khó tổng hợp và kiểm soát chính xác hợp chất nano có cấu trúc xác định để phân tích phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt, và 3) có rất nhiều vấn đề cần giải quyết về độ lặp lại và độ tin cậy do sự thay đổi về hiệu suất tăng cường theo hướng phân cực và bước sóng của ánh sáng kích thích sử dụng tại thời điểm đo phổ, nên việc ứng dụng phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt vẫn gặp nhiều trở ngại, bao gồm việc phát triển và thương mại hóa cảm biến sinh học. Do đó, cấu trúc phức hợp gồm dây nano và hạt nano đã được đề cập đến để tăng cường tín hiệu phổ Raman của các chiết xuất sinh học, protein và phân tử sinh học như ADN và để cải thiện độ lặp lại, độ nhạy và độ tin cậy của tín hiệu phổ Raman (Tài liệu sáng chế 4). Tuy nhiên, cấu trúc phức hợp gồm dây nano và hạt nano dùng để bẫy hợp chất cần định lượng sử dụng một số thụ thể, do đó vẫn không thích hợp để định lượng ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế 1: Patent Mỹ số 6143529

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn Mỹ số 2004/0259101 A1

Tài liệu sáng chế 3: WO2008/090930

Tài liệu sáng chế 4: Đơn công bố đơn số 2011-81001

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến chip sinh học để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư có nồng độ tăng trong máu theo tiến triển của bệnh ung thư, bao

gồm ADN tự do (ADN cuốn quanh histon) bằng phổ tán xạ Raman và phương pháp sản xuất chip sinh học này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các phương án sau:

1. Chip sinh học bao gồm vùng tinh thể meso trong đó bạc oxit chứa bạc peroxit được tự lắp ráp thành siêu cấu trúc không gian ba chiều dạng sợi, có khả năng tích điện âm trong mẫu sinh học và còn có hiện tượng cộng hưởng tăng cường bề mặt bằng cách chiếu ánh sáng kích thích.

2. Chip sinh học theo phương án 1, trong đó hợp chất được hấp thụ vào chip sinh học này từ mẫu sinh học chứa ADN cuốn quanh histon và sợi nhuộm sắc liên quan.

3. Phương pháp sản xuất chip sinh học bao gồm các bước: điều chế tinh thể lượng tử bạc thiosulfat được tạo ra trên tấm đồng hoặc tấm hợp kim đồng; và xử lý tinh thể lượng tử bạc thiosulfat bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion clorua để tạo ra tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa bạc peroxit hình kim hoặc nhọn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện phương pháp xác định pic ở bước sóng Raman, trong đó phổ tán xạ Raman được tạo ra bằng cách chiếu tia laze có bước sóng 633nm vào mẫu huyết thanh của người và pic thu được có cường độ tán xạ ở số sóng bằng 1350cm^{-1} và 1550cm^{-1} .

Fig.2A là đồ thị thể hiện phổ Raman của mẫu huyết thanh đã pha loãng thu được từ 12 người bị bệnh ung thư dạ dày.

Fig.2B là đồ thị thể hiện phổ Raman của mẫu huyết thanh đã pha loãng thu được từ 12 người bị bệnh ung thư đại tràng.

Fig.2C là đồ thị thể hiện phổ Raman của mẫu huyết thanh đã pha loãng thu được từ 12 người bệnh có khối u lành tính.

Fig.2D là biểu đồ so sánh mức tăng đỉnh tán xạ Raman của mẫu huyết thanh đã pha loãng thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày, người bị bệnh ung thư đại tràng, và người bệnh có khối u lành tính.

Fig.3 là phổ Raman thể hiện mối tương quan giữa các mẫu huyết thanh đã pha loãng thu được từ 12 người bị bệnh ung thư đại tràng và cường độ tán xạ Raman cho thấy rằng cường độ tán xạ, mức tăng đỉnh và nồng độ mẫu là có tương quan với nhau.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện phương pháp sản xuất chip sinh học dùng để phân tích phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt được thể hiện trong ví dụ 1, trong đó ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét trên cùng bên trái thể hiện chip sinh học do chủ đơn Mytec Co. Ltd. sản xuất.

Fig.5 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét thể hiện hạt tinh thể nano (tinh thể lượng tử) được tạo ra trong ví dụ 1.

Fig.6 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét phóng đại thể hiện hạt nano.

Fig.7 là ảnh chụp thể hiện mối tương quan giữa hình dạng tinh thể lượng tử và thời gian để yên sau khi nhỏ vào tấm đồng đồ photpho.

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng của tinh thể lượng tử (phân tích thành phần).

Fig.9 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét thể hiện tinh thể lượng tử đã xử lý bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion halogen (xử lý bằng natri hypoclorit).

Fig.10A là ảnh chụp thể hiện tinh thể hình kim của tinh thể lượng tử đã xử lý bằng dung dịch nước kiềm.

Fig.10B là ảnh chụp thể hiện khối tinh thể hình bầu dục trong tinh thể hình kim.

Fig.10C là ảnh chụp thể hiện kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng của khối tinh thể kích cỡ lớn (phân tích thành phần).

Fig.11 là hình ảnh thể hiện trạng thái của ADN tự do đã metyl hóa (a) và trạng thái của ADN đã axetyl hóa (b).

Fig.12 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét thể hiện cơ chất tái kết tinh - là cơ chất tinh thể lượng tử đã xử lý bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion halogen (xử lý bằng natri hypoclorit) và đồ thị bên dưới thể hiện kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng của cơ chất tái kết tinh (phân tích thành phần).

Fig.13 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích phổ quang điện tử quét bằng tia X của cơ chất tái kết tinh đã xử lý bằng dung dịch nước kiềm.

Fig.14 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích phổ quang điện tử quét bằng tia X sau khi ăn mòn bề mặt cơ chất tái kết tinh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khi nghiên cứu chi tiết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng đích cần phát hiện trực tiếp phải là hợp chất liên quan đến bệnh ung thư như ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư, có nồng độ tăng trong máu theo tiến triển của bệnh ung thư khi bị bệnh ung thư và tốt nhất là phát hiện trực tiếp ADN tự do mà không cần sử dụng thụ thể bất kỳ.

Theo sáng chế, ADN tự do cần phát hiện là ADN cuộn quanh protein histon, cấu trúc đơn vị với ADN cuộn quanh (1 hạt) được gọi là nucleosom và cấu trúc được tạo ra từ sợi nucleosom cuộn xoắn được gọi là sợi nhiễm sắc. Khi tế bào tiến triển đến giai đoạn ung thư và phân chia liên tiếp, thì ADN sẽ cuộn quanh histon để gen ức chế khối u không tách ra và tạo điều kiện thuận lợi để ức chế bệnh ung thư và ADN sẽ cuộn quanh histon chặt hơn bởi quá trình metyl hóa để ADN không dễ dàng tách ra khỏi histon. Thông thường, histon tích điện dương, còn ADN tích điện âm nên hai phân tử này dính vào nhau như nam châm và quá trình metyl hóa làm cho hai phân tử này không dễ dàng tháo xoắn khỏi nhau, trong đó ADN đã metyl hóa cuộn quanh histon sẽ tích điện dương (Fig.11a). Trái lại, quá trình axetyl hóa làm cho histon chuyển sang trạng thái tích điện âm khiến cho ADN tích điện âm bị đẩy ra xa khỏi histon bị chuyển sang trạng thái tích điện âm bởi quá trình axetyl hóa, dẫn đến biểu hiện gen do cơ thể tháo xoắn của sợi ADN khỏi histon (Fig.11b). Do đó, để hấp thụ hoặc bẫy một cách chọn lọc ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư dưới dạng ADN cuộn quanh histon, thì tốt hơn nếu cơ chất để hấp thụ hoặc bẫy hợp chất liên quan đến bệnh ung thư tích điện dương trong mẫu cần tích điện âm trong mẫu phân tích.

Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện thấy rằng trên cơ chất kim loại có thể điện cực thấp hơn (có xu hướng ion hóa mạnh) so với thế điện cực của kim loại tạo ra phức kim loại trong dung dịch nước phức kim loại, quá trình khử điện hóa xuất hiện do độ chênh lệch về thế điện cực giữa cơ chất kim loại và phức kim loại, dẫn đến làm kết tủa và kết tinh phức kim loại khỏi dung dịch nước lên cơ chất kim loại để tạo ra tinh thể lượng tử (tức là tinh thể phức kim loại có kích cỡ nano). Khi phức kim loại là phức bạc, thì phức bạc có thể được tạo ra dưới dạng tinh thể lượng tử chứa phức bạc do quá trình khử

điện hóa trên đồng hoặc hợp kim đồng có thế điện cực thấp hơn (có xu hướng ion hóa mạnh) so với thế điện cực của bạc trong dịch nước bạc thiosulfat. Cụ thể, nồng độ của phức kim loại trong dung dịch nước cần được xác định dựa trên kích cỡ của tinh thể lượng tử chính được tạo ra, và khi chất phân tán được sử dụng, thì nồng độ của hợp chất này cũng phải được tính đến. Mặc dù, thông thường phức kim loại có thể được sử dụng với nồng độ nằm trong khoảng từ 100ppm đến 5000ppm, nhưng tốt hơn nếu phức kim loại được sử dụng với nồng độ nằm trong khoảng từ 500ppm đến 2000ppm để thu được tinh thể nano được gọi là cụm nano phụ thuộc vào đặc tính của phối tử. Phức kim loại cần tạo ra tinh thể lượng tử có thể được chọn lọc để có hằng số ổn định phức ($\log \beta_i$) được xác định theo công thức (I) tương quan với thế điện cực E của cơ chất kim loại.

$$E^\circ = (RT/ZF) \ln (\beta_i)$$

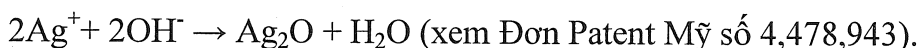
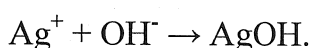
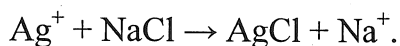
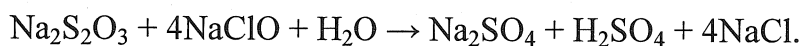
(I)

trong đó E° là thế điện cực tiêu chuẩn, R là hằng số khí lý tưởng, T là nhiệt độ tuyệt đối, Z là hóa trị của ion, và F là hằng số Faraday.

Khi phức kim loại được chọn từ nhóm bao gồm kim loại plasmon như Au, Ag, Pt và Pd, thì kim loại plasmon có vai trò tạo ra hiệu ứng tăng cường cộng hưởng plasmon bề mặt cục bộ cho phổ Raman. Cụ thể, khi phức kim loại là phức bạc, thì phức này có thể được tạo ra bằng cách cho chất tạo phức có hằng số ổn định (hằng số tạo phức, $\log \beta_i$) bằng 8 hoặc cao hơn phản ứng với bạc halogenua, trong đó tốt hơn nếu bạc halogenua được chọn giống như halogenua và chất tạo phức được chọn từ nhóm bao gồm muối thiosulfat, muối thioxyanat, muối sulfit, muối thioure, muối kali iotua, muối thiosalixylat, và muối của axit thioxyanuric. Khi phức kim loại là phức bạc, thì tinh thể lượng tử thu được có các chấm lượng tử tạo ra bởi cụm nano có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 5nm đến 20nm, do đó tinh thể lượng tử sẽ có kích cỡ nằm trong khoảng từ 100nm đến 200nm.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng phức bạc có thể được biến đổi bằng cách xử lý bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion halogen (ví dụ xử lý bằng natri hypoclorit) theo các phản ứng dưới đây thành tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa nhân là bạc peroxit và bạc halogenua tích điện âm trong nước (Fig.9), trong khi đó ADN cuốn quanh histon tích điện dương (Fig.11a), do đó hợp chất liên quan đến bệnh ung thư như ADN tự do tích điện dương được hấp thụ một cách có chọn lọc. Các tác giả

sáng chế cũng đã phát hiện thấy rằng tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa bạc peroxit hình kim hoặc nhọn có thể được khử bằng cách chiếu tia laze kích thích vào kim loại bạc, dẫn đến thu được kim loại bạc có hiệu ứng tăng cường plasmon bề mặt, nhờ đó hợp chất liên quan đến bệnh ung thư như ADN tự do đã được bẫy có thể phát hiện được bằng phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (Surface Enhanced Raman Scattering - SERS).



Sáng chế đề cập đến chip sinh học dùng để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư, trong đó chip sinh học này chứa vùng tinh thể nano của hợp chất bạc oxit hình kim chứa bạc halogenua hoặc halogen, có khả năng tích điện âm trong nước để hấp thụ hợp chất liên quan đến bệnh ung thư tích điện dương và tạo ra phức chuyển điện tích. Mặt khác, thành phần của tinh thể nano của hợp chất bạc oxit hình kim này có thể được biến đổi thành hạt nano bạc bằng cách chiếu tia laze, dẫn đến tạo ra vùng hiệu ứng tăng cường plasmon bề mặt.

Mặc dù điện cực Ag/AgCl được điện phân có kiểm soát điện thế trong dịch nước chứa ion bạc để thu được tinh thể meso bạc oxit chứa bạc peroxit- tinh thể lượng tử phức bạc, nhưng thành phần của tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa bạc peroxit hình kim hoặc nhọn theo sáng chế có thể tự lắp ráp thành siêu cấu trúc không gian ba chiều dạng sợi (sau đây gọi là tinh thể meso theo sáng chế, Fig.12 và Fig.13). Ví dụ, tinh thể lượng tử bạc thiosulfat được xử lý bằng dung dịch natri hypoclorit trong sự có mặt của ion halogen để thu được tinh thể meso bạc oxit.

Khi chip sinh học theo sáng chế được sử dụng sẽ thuận lợi cho việc phân tích mẫu sinh phẩm chứa máu bằng phổ Raman và có thể định lượng được hợp chất liên quan đến bệnh ung thư, như ADN tự do. Cụ thể, khi tinh thể nano của hợp chất bạc oxit hình kim chứa bạc halogenua hoặc halogen, tức là chip sinh học có vùng tinh thể meso bạc oxit chứa bạc peroxit được sử dụng (Fig.12 và Fig.13), thì huyết thanh hoặc dịch sinh học sẽ được nhỏ vào chip này để hợp chất liên quan đến bệnh ung thư trong huyết thanh có thể

được bày một cách chọn lọc do hợp chất liên quan đến bệnh ung thư tích điện dương trong mẫu. Sau đó, phổ tán xạ Raman của hợp chất liên quan đến bệnh ung thư được tăng cường bằng hiệu ứng tăng cường bề mặt và phát hiện. Do đó, có thể chẩn đoán được bệnh ung thư dựa trên cường độ của phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt.

Hợp chất liên quan đến bệnh ung thư trong huyết thanh bao gồm ADN cuộn quanh histon có nguồn gốc từ tế bào ung thư (được gọi là ADN tự do theo sáng chế), cấu trúc đơn vị nucleosom (1 hạt) và sợi nhiễm sắc có cấu trúc dạng chuỗi chứa nucleosom. Mặc dù huyết thanh chứa globulin tích điện dương, nhưng nồng độ của globulin chỉ tăng cao nhất là hai lần hoặc nhỏ hơn, và do quá trình tiến triển bệnh ung thư có thể làm tăng nồng độ hợp chất liên quan đến bệnh ung thư phát hiện được bằng chip sinh học theo sáng chế lên đến 100 lần hoặc cao hơn, tức là hợp chất này (ADN tự do có nguồn gốc từ tế bào ung thư) có thể được phát hiện ở nồng độ cao hơn. Ngoài ra, mặc dù tổng hàm lượng của ADN phân tách từ tế bào bình thường, ADN phân tách khỏi histon bởi quá trình axetyl hóa và albumin trong huyết thanh bằng khoảng 60%, nhưng để nhận diện tích âm thì các hợp chất này sẽ không bị bắt bởi chip theo sáng chế. Do đó, hợp chất liên quan đến bệnh ung thư có thể được định lượng một cách thuận lợi.

Hơn nữa, tinh thể nano hình kim theo sáng chế (tinh thể meso trong đó bạc oxit chứa bạc peroxit) dễ dàng tích điện âm trong dung dịch nước, do đó tinh thể meso theo sáng chế có thể tạo ra phức chuyển điện tích khi tiếp xúc với phân tử đích như hợp chất liên quan đến bệnh ung thư. Ngoài ra, do bạc oxit bị khử thành hạt kim loại bạc khi nhận năng lượng ánh sáng, nên hiệu ứng tăng cường cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng cho hạt tinh thể nano kim loại sắp xếp có trật tự có xuất hiện ở tinh thể meso. Mặc dù tinh thể hình kim (tinh thể meso) theo sáng chế là hợp chất phi kim, nhưng tinh thể này vẫn có cả đặc tính kim loại lẫn ion hóa, do đó chip sinh học theo sáng chế thích hợp để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư bằng phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt.

Phức kim loại để tạo ra tinh thể lượng tử có thể được chọn để có hằng số ổn định phức ($\log\beta_i$) được xác định theo công thức (I) tương quan với thế điện cực E của cơ chất kim loại.

$$E^\circ = (RT/|Z|F) \ln (\beta_i)$$

(I)

trong đó, E° là thế điện cực tiêu chuẩn, R là hằng số khí lý tưởng, T là nhiệt độ tuyệt đối, Z là hóa trị của ion, và F là hằng số Faraday.

Khi phức kim loại được chọn từ nhóm bao gồm kim loại plasmon như Au, Ag, Pt and Pd, thì kim loại plasmon có vai trò tạo ra hiệu ứng tăng cường cộng hưởng plasmon bề mặt cục bộ cho phổ Raman. Cụ thể, khi phức kim loại là phức bạc, thì phức này có thể được tạo ra bằng cách cho chất tạo phức có hằng số ổn định (hằng số tạo phức, $\log \beta_i$) bằng 8 hoặc cao hơn phản ứng với bạc halogenua, trong đó tốt hơn nếu bạc halogenua được chọn giống như halogenua và chất tạo phức được chọn từ nhóm bao gồm muối thiosulfat, muối thioxyanat, muối sulfit, muối thioure, muối kali ioduua, muối thiosalixylat, và muối của axit thioxyanuric. Khi phức kim loại là phức bạc, thì tinh thể lượng tử thu được có các chấm lượng tử tạo ra bởi cụm nano có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ 5nm đến 20nm, do đó tinh thể lượng tử sẽ có kích cỡ nằm trong khoảng từ 100nm đến 200nm.

Nồng độ của phức kim loại trong dung dịch nước cần được xác định bằng cách dựa trên kích cỡ của tinh thể lượng tử chính được tạo ra, và khi chất phân tán được sử dụng, thì nồng độ của hợp chất này cũng phải được tính đến. Mặc dù, thông thường phức kim loại có thể được sử dụng với nồng độ nằm trong khoảng từ 100ppm đến 5000ppm, nhưng tốt hơn nếu phức kim loại được sử dụng với nồng độ nằm trong khoảng từ 500ppm đến 2000ppm để thu được tinh thể nano được gọi là cụm nano phụ thuộc vào đặc tính của phối tử.

Được tin là tinh thể lượng tử được tạo ra trên cơ chất kim loại hoặc hạt kim loại có khả năng tích điện dương trong dung dịch nước như hạt tinh thể phức kim loại, để cho phép hấp thụ protein trong mẫu sinh phẩm, tốt hơn nếu khả năng tích điện dương của tinh thể lượng tử được điều chỉnh bằng cách xử lý bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion halogenua, ví dụ bằng cách nhỏ dung dịch natri hypoclorit có độ pH = 11 hoặc cao hơn vào. Khi đó, tinh thể lượng tử tái kết tinh không chỉ có khả năng tích điện âm trong dung dịch nước mà còn tạo ra tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa bạc peroxit hình kim hoặc nhọn, trong đó mẫu hợp chất liên quan đến bệnh ung thư tích điện dương có nguồn gốc từ tế bào ung thư có thể thích hợp để cố định ADN tự do.

Nồng độ protein tổng số trong mẫu sinh phẩm có thể được đo bằng phổ Raman thu được từ quá trình chiếu tia laze có bước sóng đặc trưng. Fig.3 là đồ thị thể hiện phổ

Raman, trong đó mẫu huyết thanh thu được từ người bị bệnh ung thư đại tràng được pha loãng 10 lần, 100 lần, 500 lần, 1000 lần và 10000 lần với nước tinh khiết và đo bằng tia laze có bước sóng 633nm (30mW) để thu được mức tăng đỉnh (Peak Shifting Value - PSV) và hệ số tích hợp pic, mà thay đổi theo nồng độ. Do đó, protein tổng số trong huyết thanh có thể dễ dàng được định lượng. Kết quả phân tích phổ Raman trên Fig.3 cho thấy các pic cụ thể quan sát được ở băng G đặc trưng cacbon ở số sóng nằm trong khoảng từ 1300cm^{-1} đến 1400cm^{-1} và băng D ở số sóng nằm trong khoảng từ 1550cm^{-1} đến 1600cm^{-1} , và pic đặc trưng cũng quan sát được ở số sóng khoảng 2900cm^{-1} đối với nhóm metyl. Các pic quan sát được trên phổ Raman này cho thấy hợp chất liên quan đến bệnh ung thư có thể được phát hiện ở dạng ADN đã metyl hóa cuộn quanh histon.

Do đó, có thể chẩn đoán và theo dõi tiến triển bệnh ung thư dựa trên các thông tin như chiều cao pic, hệ số tích hợp pic và tần số pic của phổ Raman thu được. Fig.1 là đồ thị thể hiện phương pháp xác định pic bằng phổ tán xạ Raman được tạo ra bằng cách chiếu tia laze có bước sóng 633nm vào mẫu huyết thanh của người để kiểm chứng pic thu được có cường độ tán xạ ở số sóng 1350cm^{-1} và 1550cm^{-1} . Do đó, dựa trên trị số trung bình (m) của số sóng (a) bằng 800cm^{-1} và số sóng (b) bằng 2000cm^{-1} của cường độ tán xạ, mức tăng đỉnh (p-m) được xác định dưới dạng hệ số dịch chuyển pic (Peak Shifting Value - PSV). Hệ số tích hợp pic được xác định là diện tích toàn bộ pic. Mức tăng đỉnh, hệ số tích hợp pic cùng với tần số pic là các thông số quan trọng để định lượng hợp chất liên quan đến bệnh ung thư trong huyết thanh của người - là chất chỉ thị để chẩn đoán và theo dõi tiến triển bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ sau, nhưng cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Như được thể hiện trên Fig.4, dung dịch nước chứa 1000ppm bạc thiosulfat được điều chế và 1 giọt dung dịch này được nhỏ vào tấm đồng đỏ photpho. Sau khi nhỏ, tấm đồng đỏ photpho này được để yên trong khoảng 3 phút, dung dịch trên tấm được thổi bay. Tinh thể lượng tử được tạo ra trên tấm này như được thể hiện bằng hình ảnh kính hiển vi điện tử quét ở bên phải Fig.4.

Fig.5 là các ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét thể hiện hạt tinh thể nano (tinh thể lượng tử) được điều chế trong ví dụ 1, và Fig.6 là ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét phóng đại thể hiện tinh thể hình trụ lục giác dẹt có bề mặt không nhẵn và kích cỡ khoảng 100nm. Các tác giả sáng chế đã không phát hiện được thiết diện đặc trưng bất kỳ của tinh thể nano kim loại trong tinh thể lượng tử này.

Fig.7 là ảnh chụp kính hiển vi thể hiện mối tương quan giữa hình dạng tinh thể lượng tử và thời gian để yên sau khi nhỏ dung dịch bạc thiosulfat vào tấm đồng đỏ photpho, trong đó đã ghi nhận được rằng tinh thể lượng tử hình lục giác được tạo ra, sau đó phát triển và vẫn giữ nguyên hình dạng tinh thể.

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng của tinh thể lượng tử, trong đó không chỉ bạc mà cả các nguyên tố có nguồn gốc từ các phối tử phức có thể được phát hiện khi tinh thể lượng tử được tạo ra trên tấm đồng đỏ photpho, trong khi đó chỉ có bạc được phát hiện khi tinh thể lượng tử được tạo ra trên tấm đồng bằng cách nhỏ dung dịch nước chứa 1000ppm bạc thiosulfat vào tấm đồng, sau đó để yên trong khoảng 3 phút.

Bàn luận về sự hình thành tinh thể lượng tử

Khi dung dịch nước chứa 1000ppm phức bạc thiosulfat được sử dụng, tinh thể hình trụ lục giác dẹt có kích cỡ khoảng 100nm được tạo ra khi để yên trong 3 phút sau khi nhỏ dung dịch này vào tấm đồng đỏ photpho, và ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét (Fig.4, Fig.5 và Fig.6) cho thấy tinh thể lượng tử hình trụ lục giác dẹt này có bề mặt không nhẵn và không phát hiện được thiết diện đặc trưng của tinh thể nano kim loại, trong khi đó kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng phát hiện được cả bạc lẫn các nguyên tố có nguồn gốc từ phối tử phức. Theo đó, từ phân tích nêu trên có thể dự đoán được rằng toàn bộ hạt tinh thể nano bạc có bề mặt không nhẵn có thể được tạo ra bởi sự hình thành chấm lượng tử rộng tạo ra bởi cụm bạc trong các phức. Hiện tượng này cho thấy tinh thể phức bạc lượng tử theo sáng chế có thể được tạo ra trên tấm đồng đỏ photpho, đồng thời hạt tinh thể nano bạc cũng có thể được tạo ra một cách riêng biệt trên tấm đồng, và đã dự đoán được rằng khi điện thế cân bằng của phức bạc thiosulfat bằng 0,33 tương đương với điện thế cực của đồng bằng 0,34, thì chỉ có tinh thể bạc được tạo ra với điện thế cực bằng 0,80 trên tấm đồng. Mặt khác, khi tấm đồng đỏ photpho có điện thế cực bằng 0,22 - hơi cao hơn thế điện cực của đồng được sử dụng thì tinh thể phức bạc có

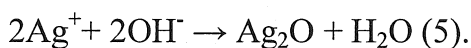
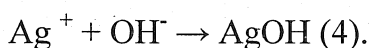
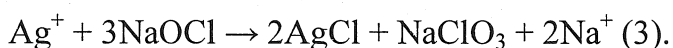
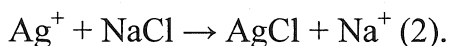
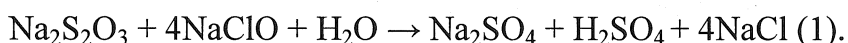
thể được tạo ra. Dung dịch nước chứa phức bạc cần được pha loãng đến nồng độ nằm trong khoảng từ 500ppm đến 2000ppm, 2) điện thế cực của cơ chất kim loại phải hơi cao hơn điện thế cân bằng của dung dịch phức kim loại, 3) phức kim loại cần được kết tủa bởi độ chênh lệch thế điện cực giữa cơ chất kim loại và phức kim loại. Hơn nữa, khi dung dịch nước chứa 1000ppm phức bạc thioure được sử dụng, cũng quan sát thấy đặc tính tương tự.

Ví dụ 2

Cơ chất tinh thể lượng tử bạc thiosulfat được tạo ra trên tấm đồng đỏ photpho trong ví dụ 1 được điều chế và dung dịch nước natri hypoclorit có độ pH = 11 được nhỏ vào tấm này. Sau khi nhỏ, dung dịch này được để yên trên tấm trong 3 phút, sau đó được thổi bay khỏi tấm để thu được chip sinh học dùng để phân tích phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt. Mặt khác, toàn bộ các mẫu huyết thanh thu được từ 12 người bị bệnh ung thư dạ dày, 12 người bị bệnh ung thư biểu mô đại tràng và 12 người bệnh có khối u lành tính được pha loãng 10 lần để thu được các mẫu thử nghiệm được đo bằng phổ Raman thu được bằng cách chiếu bằng tia laze có bước sóng 633nm vào các mẫu này. Đối với các mẫu thử nghiệm thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày và người bị bệnh ung thư đại tràng quan sát thấy mối tương quan chặt chẽ giữa mức độ tiến triển bệnh và mức tăng đỉnh cũng như hệ số tích hợp pic. Ngoài ra, đối với các mẫu thử nghiệm thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày, pic đã xuất hiện trên phổ Raman sau 1 phút chiếu tia laze, và đối với các mẫu thử nghiệm thu được từ người bị bệnh ung thư đại tràng pic đã xuất hiện trên phổ Raman sau 2-3 phút chiếu tia laze. Tương tự, Fig.2D là đồ thị so sánh mức tăng đỉnh tán xạ Raman của các mẫu thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày, người bị bệnh ung thư đại tràng và người bệnh có khối u lành tính. Pic của mẫu huyết thanh thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày và mẫu huyết thanh thu được từ người bị bệnh ung thư đại tràng cao hơn đáng kể pic của mẫu huyết thanh thu được từ người bệnh có khối u lành tính. Mặc dù khó phát hiện được sự khác biệt về mức tăng đỉnh của mẫu huyết thanh thu được từ người bị bệnh ung thư dạ dày và mẫu huyết thanh thu được từ người bị bệnh ung thư đại tràng, nhưng đều có thể chẩn đoán được cả hai bệnh ung thư này dựa vào thời gian lưu và hệ số tích hợp pic.

Bàn luận về sự hình thành tinh thể meso bạc oxit: phần 1

Dung dịch natri hypoclorit 5% được nhỏ vào cơ chất tinh thể lượng tử và dung dịch này được thổi bay sau 2 phút để thu được cấu trúc tinh thể như được thể hiện trên Fig.12, trong đó quan sát thấy tinh thể hình kim và khối tinh thể kích cỡ lớn như khối tinh thể hình bầu dục và các thành phần tương ứng được phân tích bằng phổ tán sắc năng lượng (phân tích thành phần). Kết quả phân tích cho thấy tinh thể hình kim này chứa cả bạc oxit và bạc clorua được tạo ra từ các phản ứng dưới đây và kết quả phân tích trên Fig.12 không phát hiện được clo mà phát hiện được chủ yếu bạc và oxy.



Do đó, mặc dù ion bạc và ion thiosulfat được xem là yếu tố quan trọng để tạo ra tinh thể meso theo sáng chế bằng phản ứng oxy hóa kiềm trong sự có mặt của ion clorua và bạc oxit được tạo ra bằng phản ứng thông thường, nhưng ngạc nhiên là kết quả phân tích phổ quang điện tử quét bằng tia X cho thấy bạc peroxit mới được tạo ra chủ yếu..

Bàn luận về sự hình thành tinh thể meso bạc oxit: Phần 2

Phổ quang điện tử quét bằng tia X

Dung dịch nước natri hypoclorit được nhỏ giọt vào cơ chất tinh thể lượng tử được điều chế nêu trên trong 2 phút để thu được cơ chất tái kết tinh, được phân tích phổ quang điện tử quét bằng tia X bằng thiết bị ULVAC-PHI (Ltd.)/PHI5000 Versa Probe II mà không ăn mòn Ag và O. Ngoài ra, để so sánh, Ag có trong bột bạc clorua và bột bạc oxit cũng được đo. Mặt khác, cơ chất tái kết tinh được phân tích về thành phần Ag và O bằng phổ quang điện tử quét bằng tia X sau khi ăn mòn trong 5 phút bằng sún phun cụm ion khí argon. Kết quả phân tích phổ quang điện tử quét bằng tia X trên Fig.13 và Fig.14 và kết quả phân tích phổ tán xạ năng lượng trên Fig.2 cho thấy pic ở khoảng 529eV là pic có nguồn gốc từ bạc peroxit (AgO), trong khi đó pic ở khoảng 530eV là pic có nguồn gốc từ bạc oxit (Ag₂O). Hơn nữa, khi được ăn mòn, hàm lượng oxy giảm, trong khi đó pic O có nguồn gốc từ bạc peroxit (AgO) ở khoảng 529eV vẫn rộng hơn pic O có nguồn gốc từ bạc oxit ở khoảng 530eV, do đó đã kiểm chứng được rằng bạc peroxit được tạo ra ở gần

cơ chất. Đã biết rằng điện thế cực của cơ chất và hoạt tính xúc tác bị ảnh hưởng bởi sự hình thành tinh thể meso.

Cơ chất tái kết tinh nêu trên được phân tích phổ tán xạ năng lượng bằng kính hiển vi quét trường phát xạ JEOL Ltd./JSM-7001F.

Ngoài ra, khi dung dịch nước được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch axit hypoclorơ, natri hydroxit 0,01N, axit hydrocloric 0,01N và natri carbonat 0,1M thì không thu được kết quả tương tự như khi xử lý bằng natri hypoclorit. Do đó, được tin rằng tinh thể hình kim được tạo bởi phản ứng nêu trên trong sự có mặt của ion bạc và ion thiosulfat. Mặc dù bạc oxit tích điện âm trong dung dịch nước, nhưng hợp chất này bị khử bởi tia laze để kết tủa kim loại bạc. Do bạc peroxit bị khử mạnh hơn bạc oxit, nên hợp chất liên quan đến bệnh ung thư tích điện dương có thể được hấp thụ, và làm xuất hiện hiệu ứng tăng cường plasmon bề mặt giữa hợp chất liên quan đến bệnh ung thư đã được bẫy và hạt bạc.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phương pháp theo sáng chế có thể phát hiện được một cách chọn lọc hợp chất liên quan đến bệnh ung thư trong máu và mẫu sinh phẩm bằng phổ Raman, do đó có thể phát hiện sớm và tiên lượng được tiến triển bệnh ung thư.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chip sinh học bao gồm vùng tinh thể meso trong đó bạc oxit chứa bạc peroxit được tự lắp ráp thành siêu cấu trúc không gian ba chiều dạng sợi, có khả năng tích điện âm trong mẫu sinh học và còn có hiện tượng cộng hưởng tăng cường bề mặt bằng cách chiếu ánh sáng kích thích.
2. Chip sinh học theo điểm 1, trong đó hợp chất được hấp thụ vào chip sinh học này từ mẫu sinh học chứa ADN cuốn quanh histon và sợi nhiễm sắc liên quan.
3. Phương pháp sản xuất chip sinh học bao gồm các bước: điều chế tinh thể lượng tử bạc thiosulfat được tạo ra trên tấm đồng hoặc tấm hợp kim đồng; và xử lý tinh thể lượng tử bạc thiosulfat bằng dung dịch nước kiềm trong sự có mặt của ion clorua để tạo ra tinh thể nano của hợp chất bạc oxit chứa bạc peroxit hình kim hoặc nhọn.

Fig.1

Phương pháp xác định các pic ở bước sóng Raman

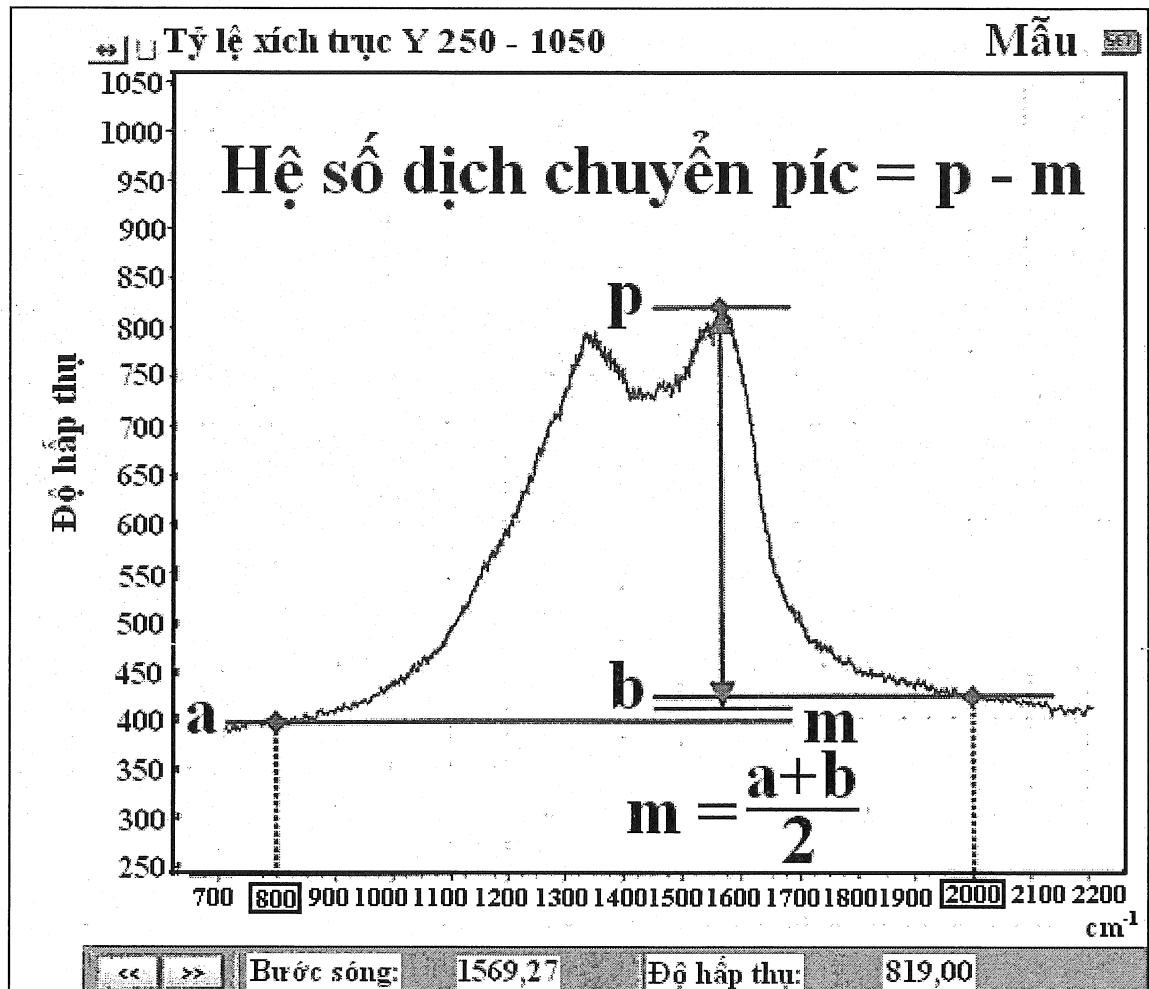


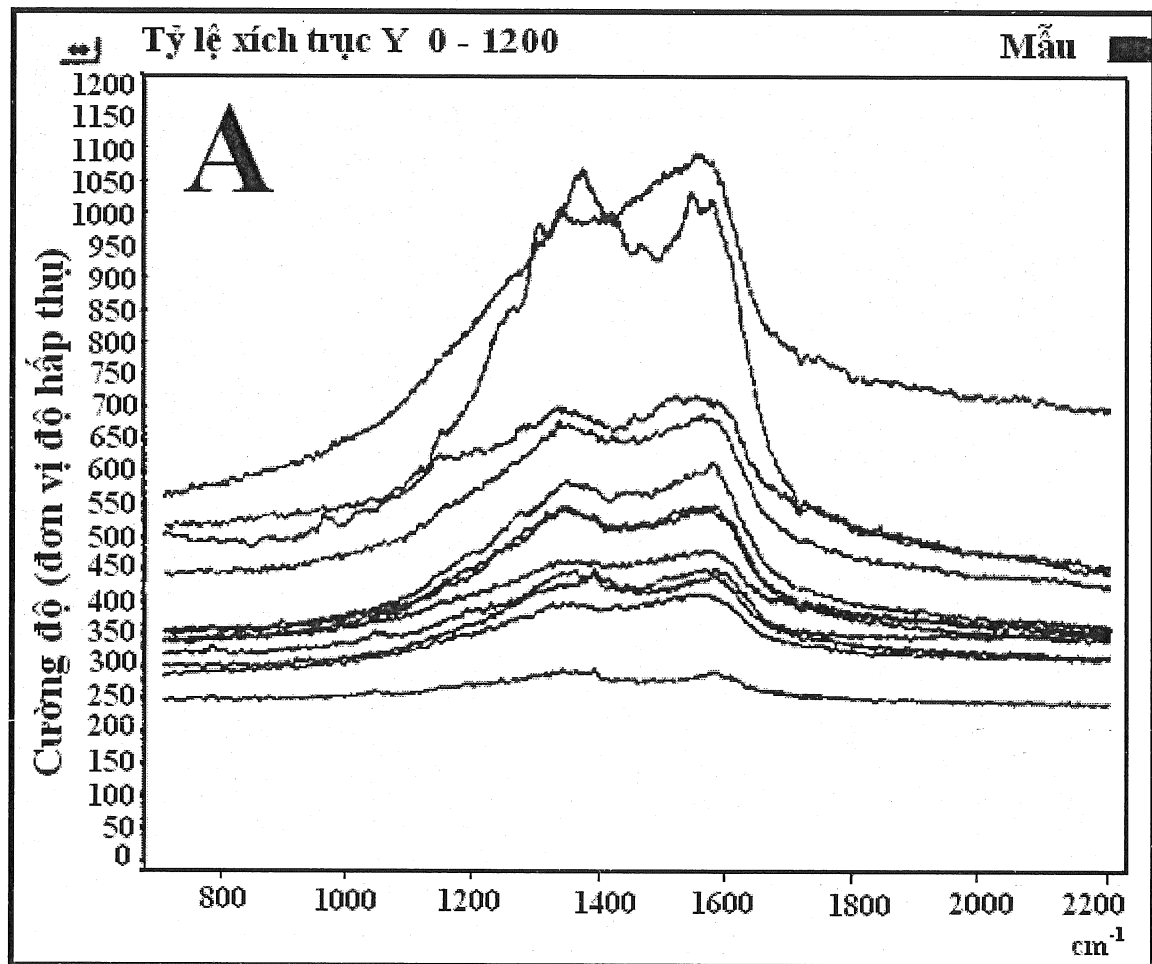
Fig.2A

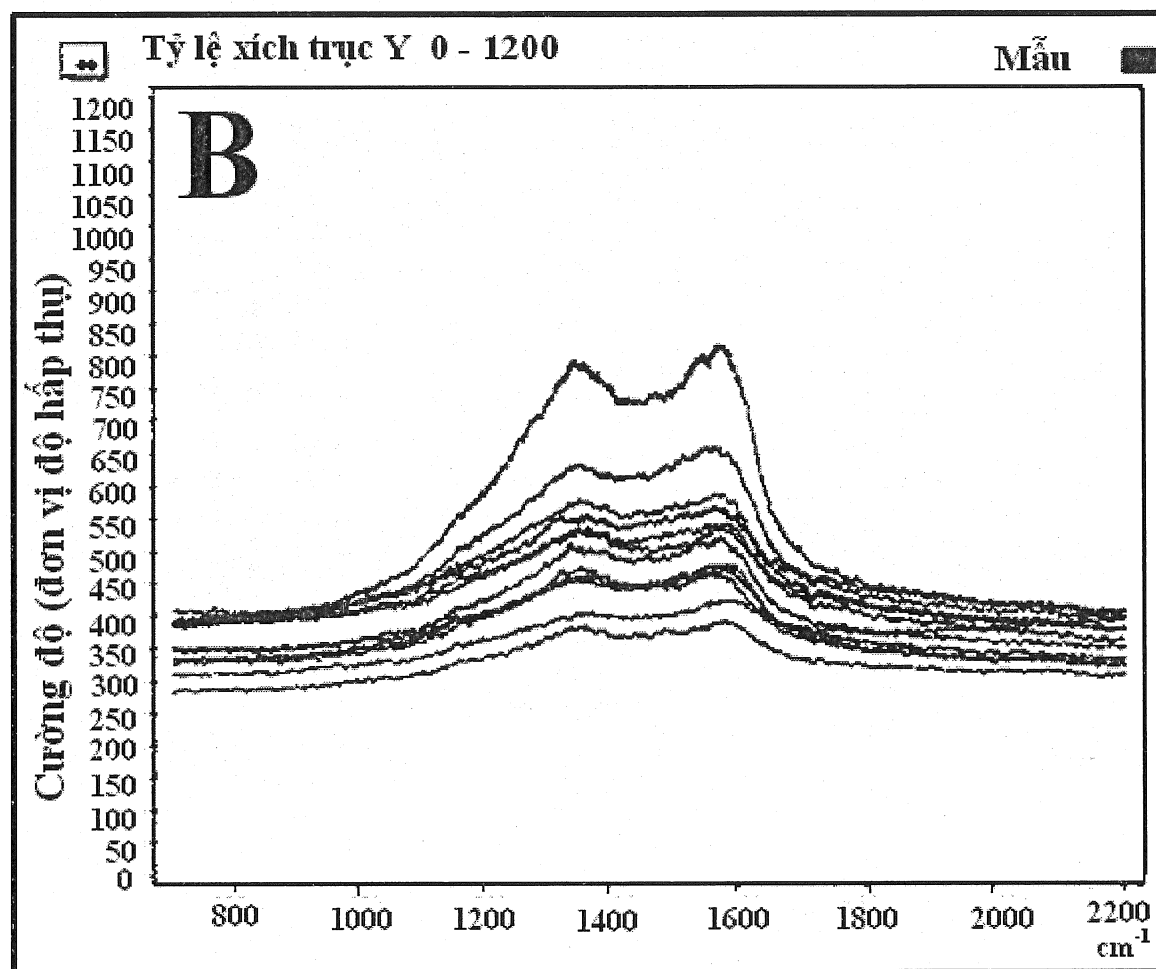
Fig.2B

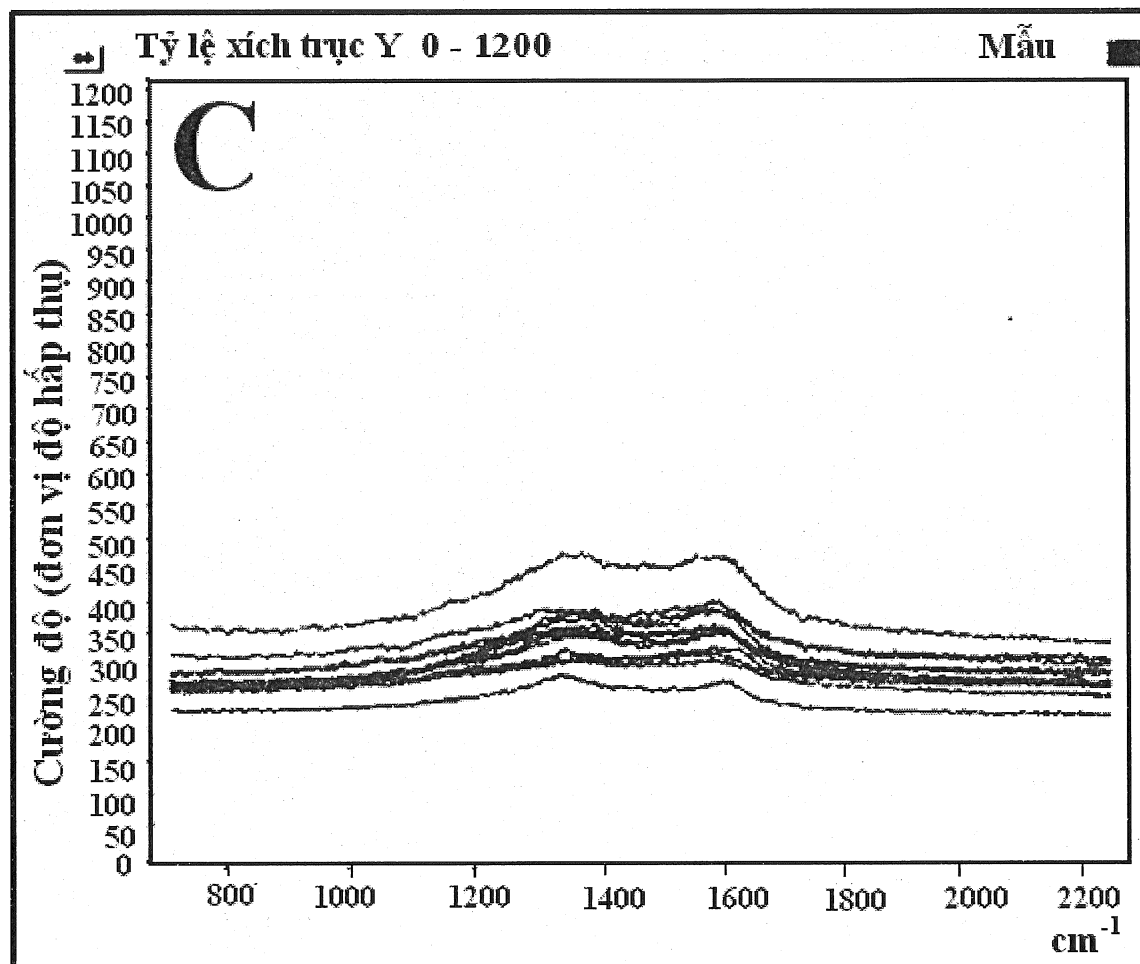
Fig.2C

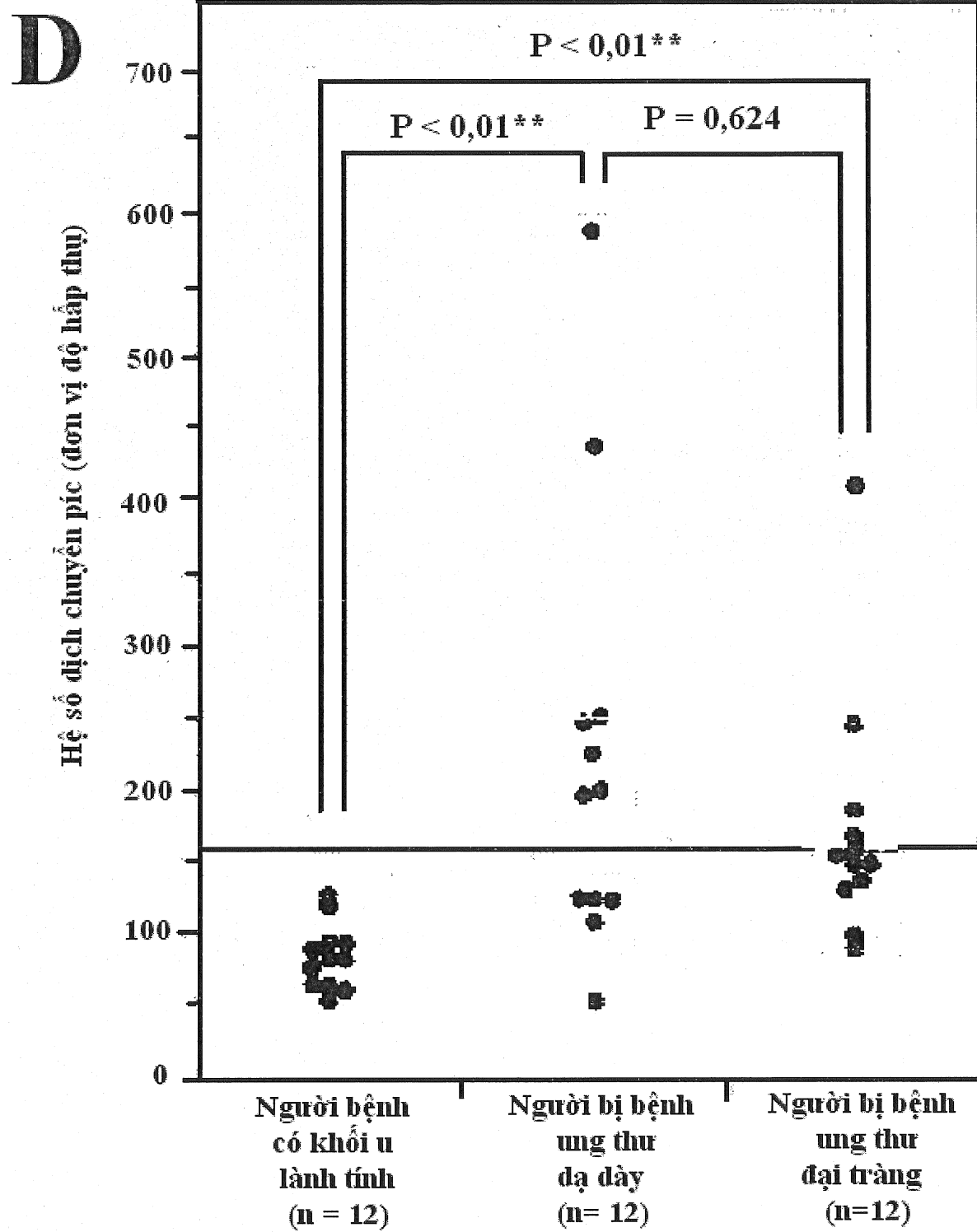
Fig.2D

Fig.3

Mẫu pha loãng và cường độ phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt

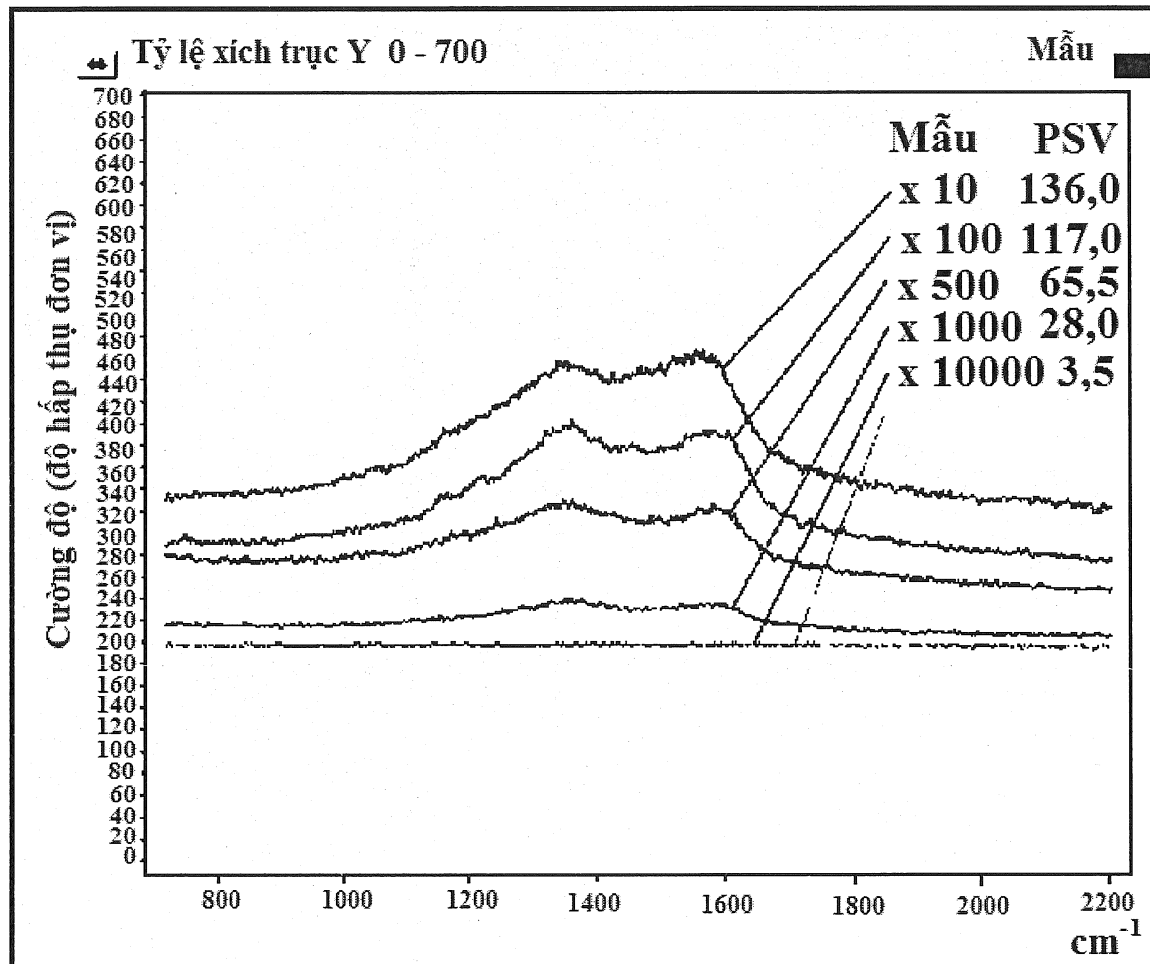


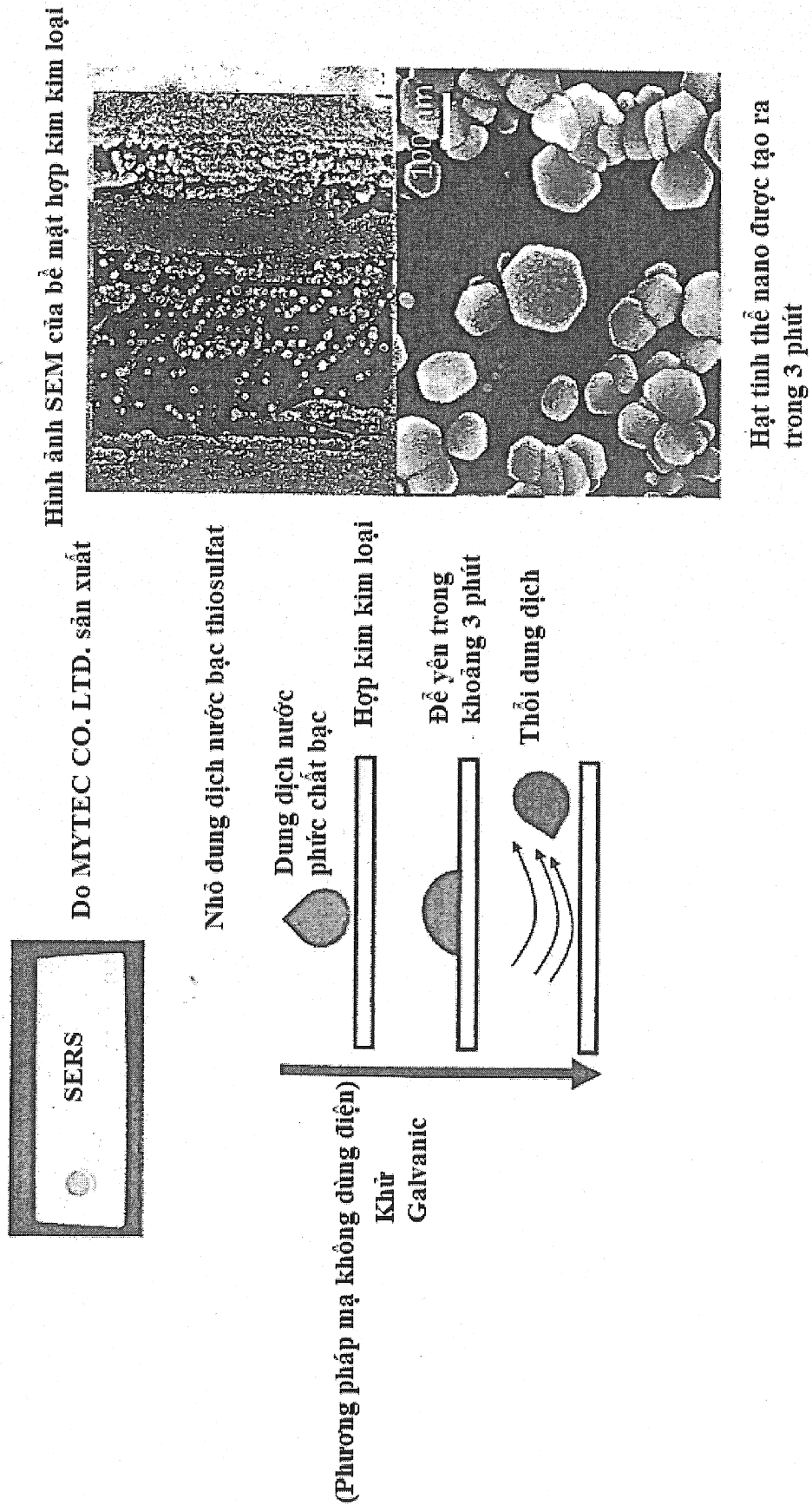
Fig.4

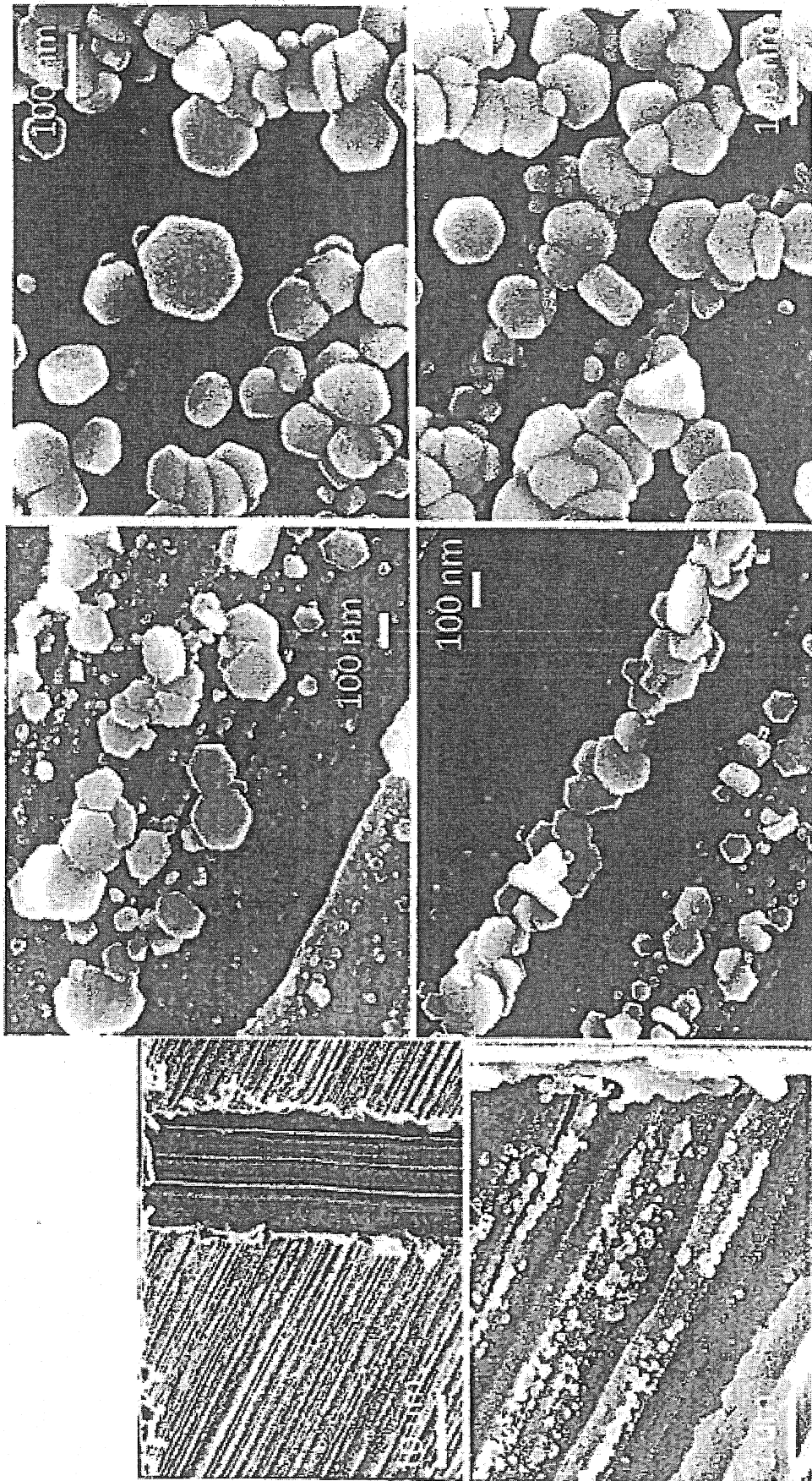
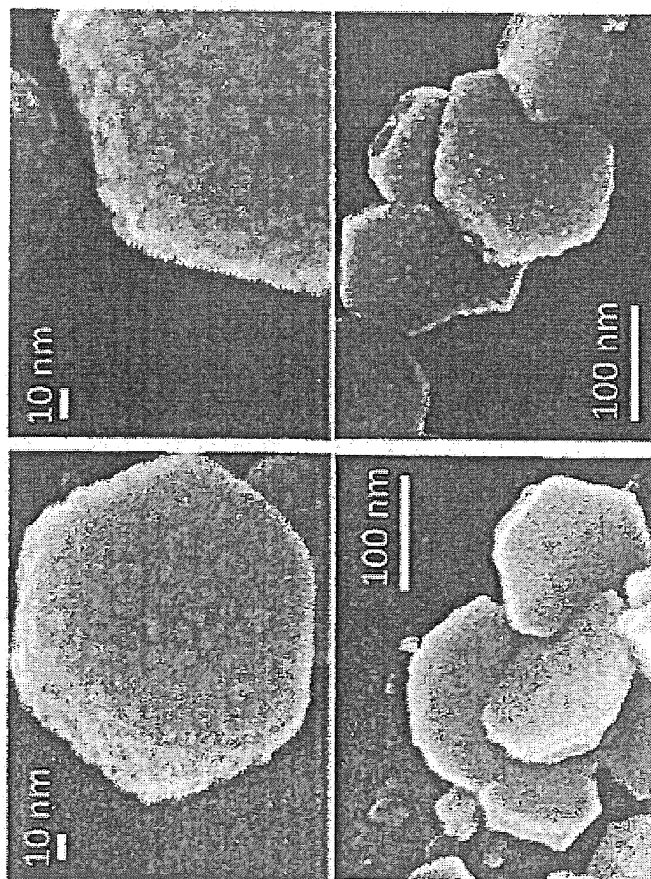
Fig.5

Fig.6

Hạt bạc được tạo ra bằng phương pháp thông thường

Hình ảnh TEM của hạt nano bạc được tạo ra bằng cách khử bạc nitrat bằng axit xitric



Tinh thể lượng tử dạng hình trụ lục giác dẹt không có thiết diện đặc trưng của tinh thể nano kim loại



Hình thái của thiết diện thể hiện tinh thể nano bạc

Cấu trúc nano nêu trên khác biệt với cấu trúc nano của hạt bạc được tạo ra bằng phương pháp thông thường

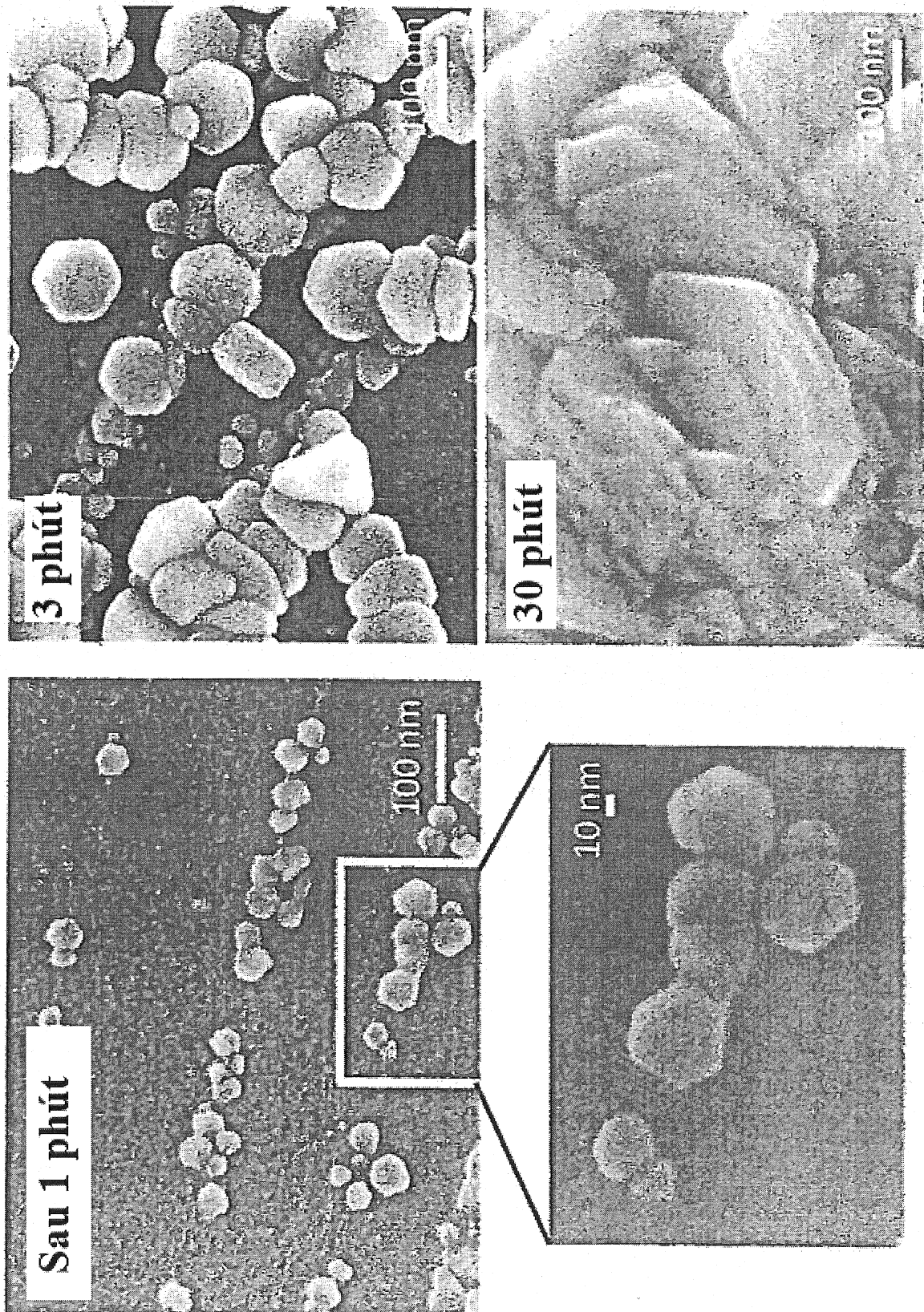
Fig.7

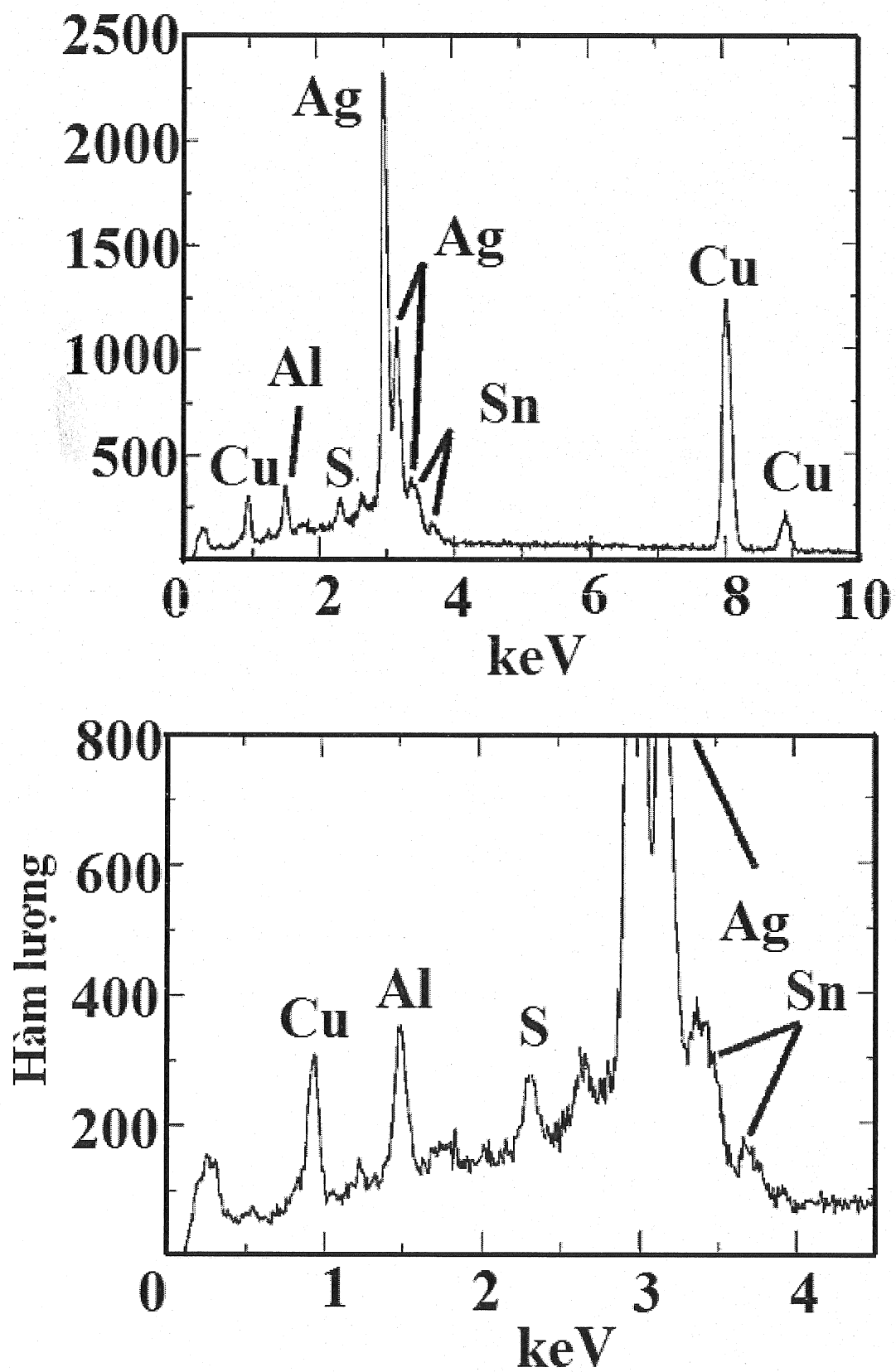
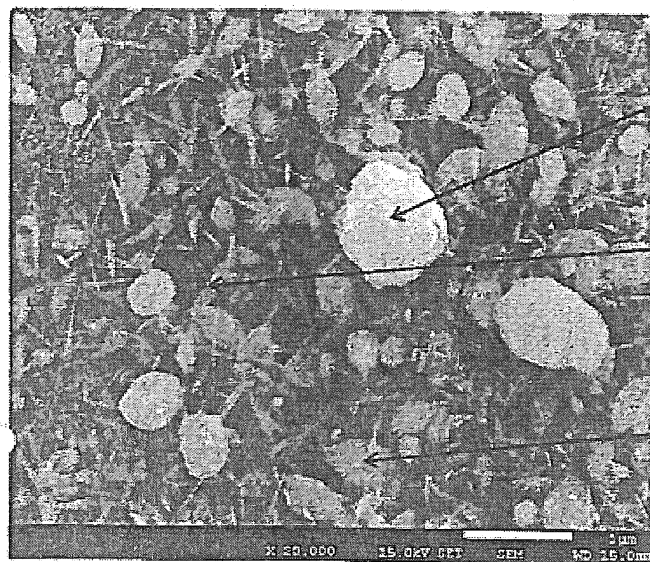
Fig.8

Fig.9

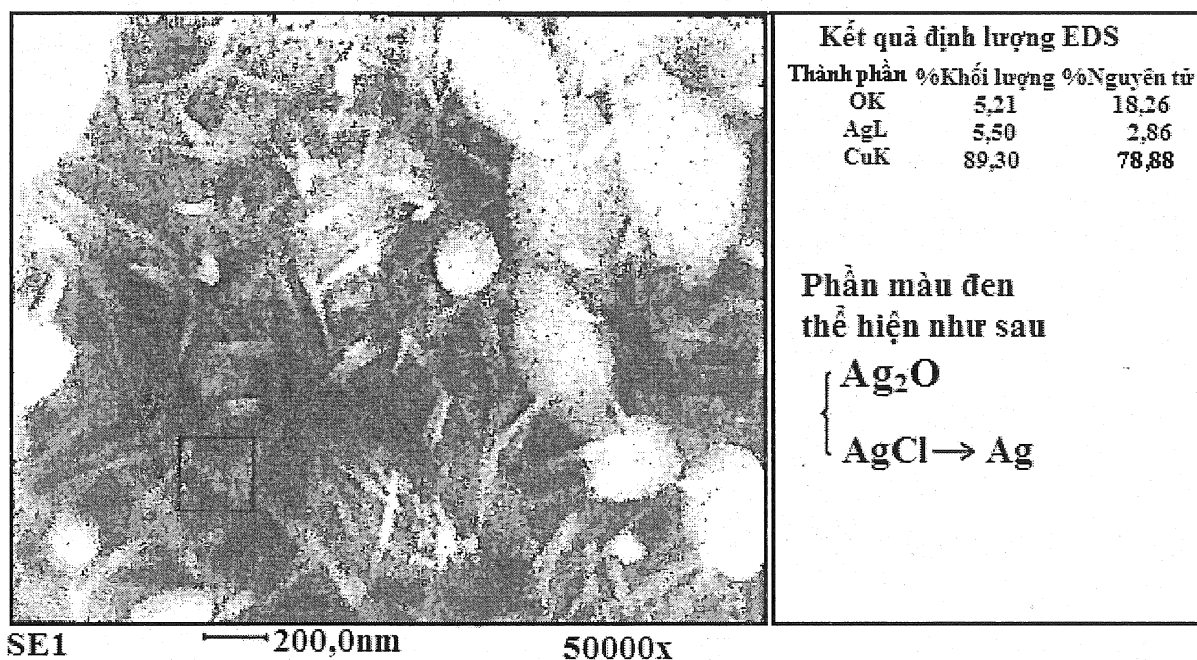
Khối tinh thể kích cỡ lớn

Tinh thể hình kim

Khối hình bầu dục

Đo tại Trung tâm Công nghệ Hyogo

Fig.10A



C:\VEDAX32\GENESIS\GENMAPS.SPC

kV: 15,0 Tilt: 0,00 Tkoff: 34,87 SDD Apollo XV Độ phân giải: 126,5 Nhiệt độ tuyệt đối: 6,4

FS: 3252 LSec: 69,7 Prst: Không 14/08/2013 12:34:08

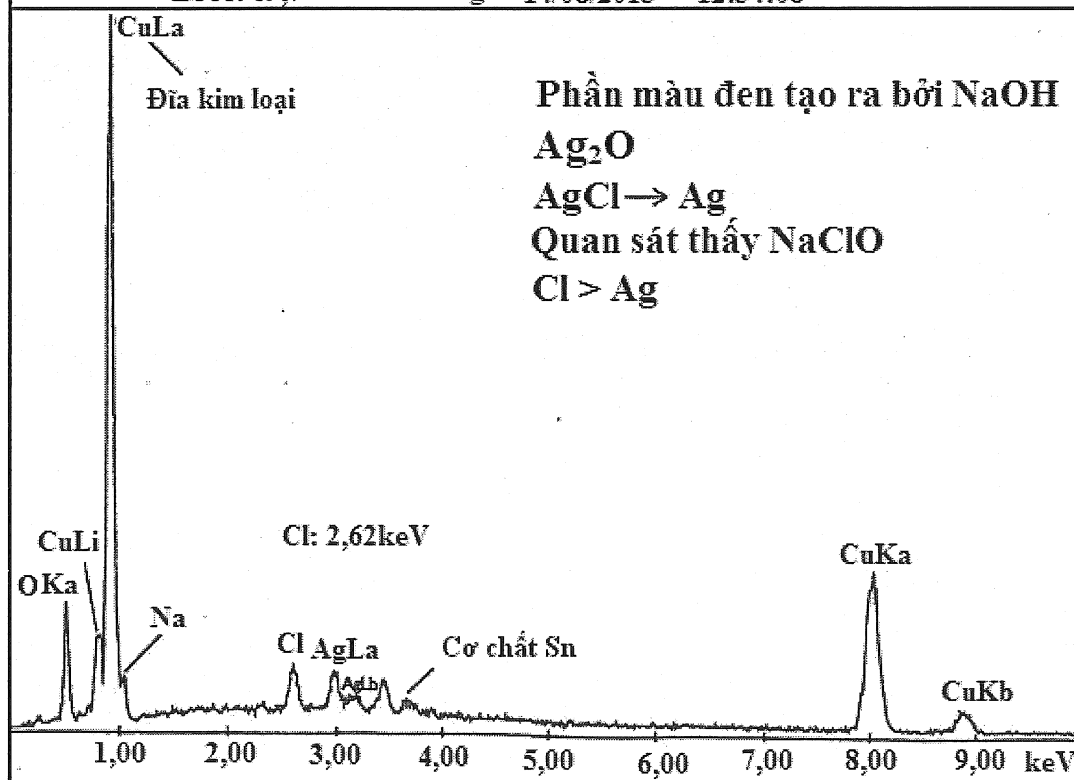
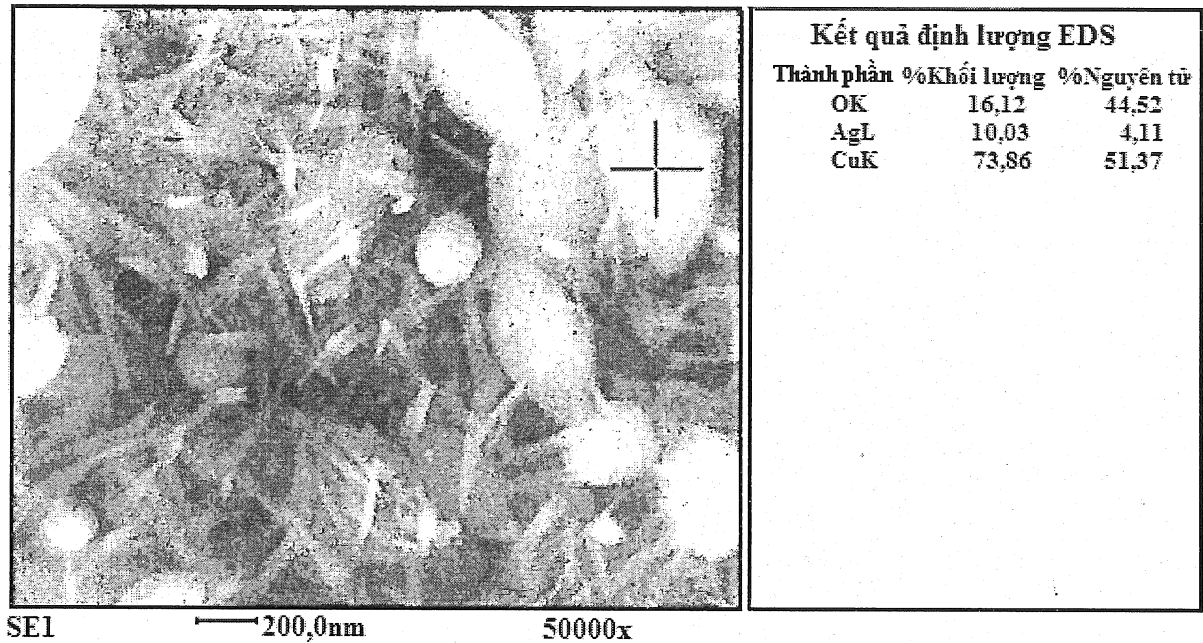


Fig.10B

G:\VEDAX32V\GENESIS\SVGENMAPS.SPC

kV: 15,0 Tilt: 0,00 Tkoff: 34,87 SDD Apollo XV Độ phân giải: 126,5 Nhiệt độ tuyệt đối: 6,4

FS: 4057 LSec: 64.9 Prst: Không 14/08/2013 12:32:38

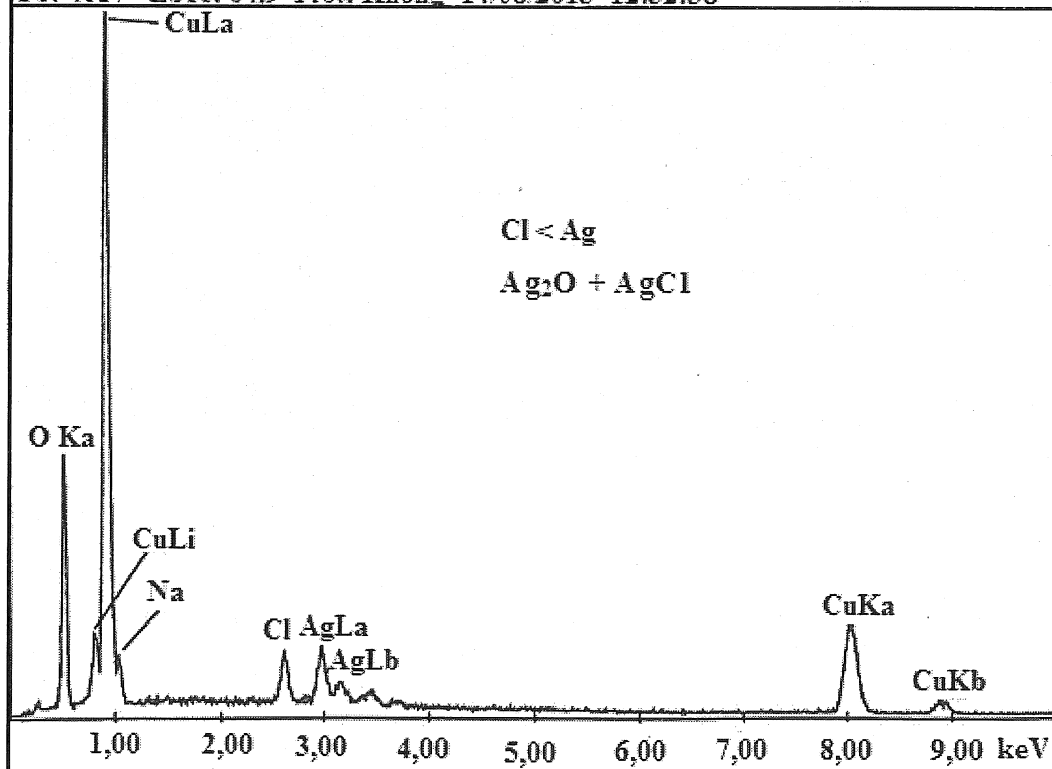
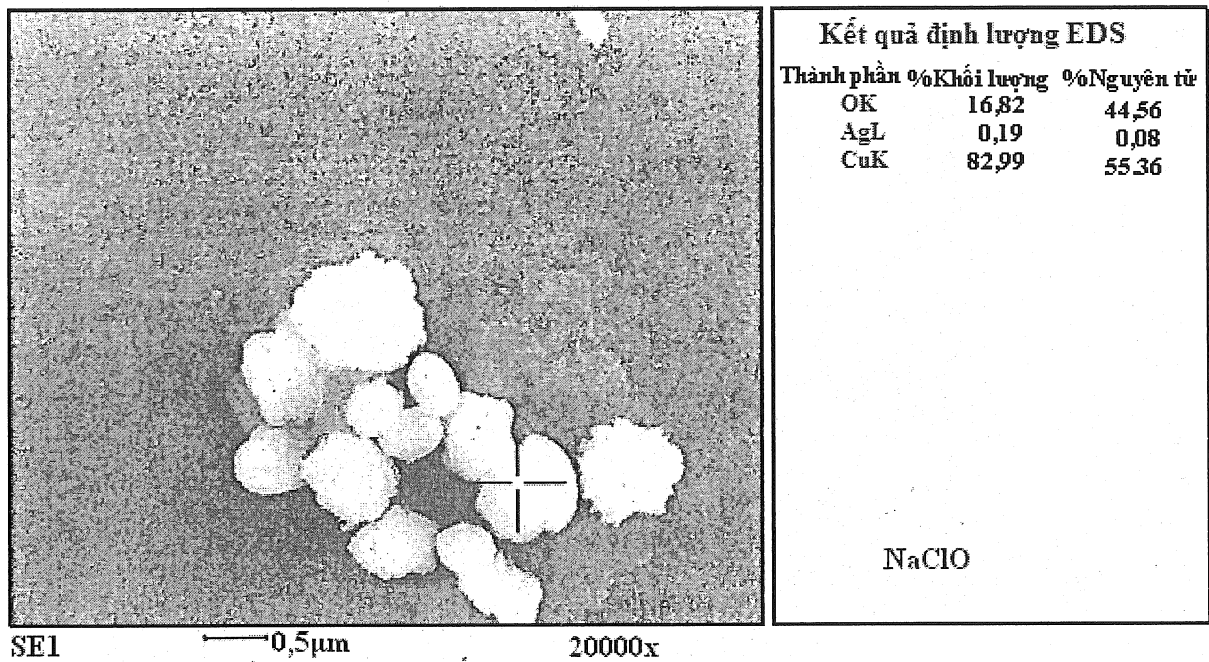


Fig.10C



C:\VEDAX32\GENESIS\GENMAPS.SPO

kV: 15,0 Tilt: 0,00 Tkoff: 35,04 SDD Apollo XV Độ phân giải: 126,5 Nhiệt độ tuyệt đối: 6,4

FS: 3124 LSec: 36,2 Prst: Không 20/08/2013 10:35:41

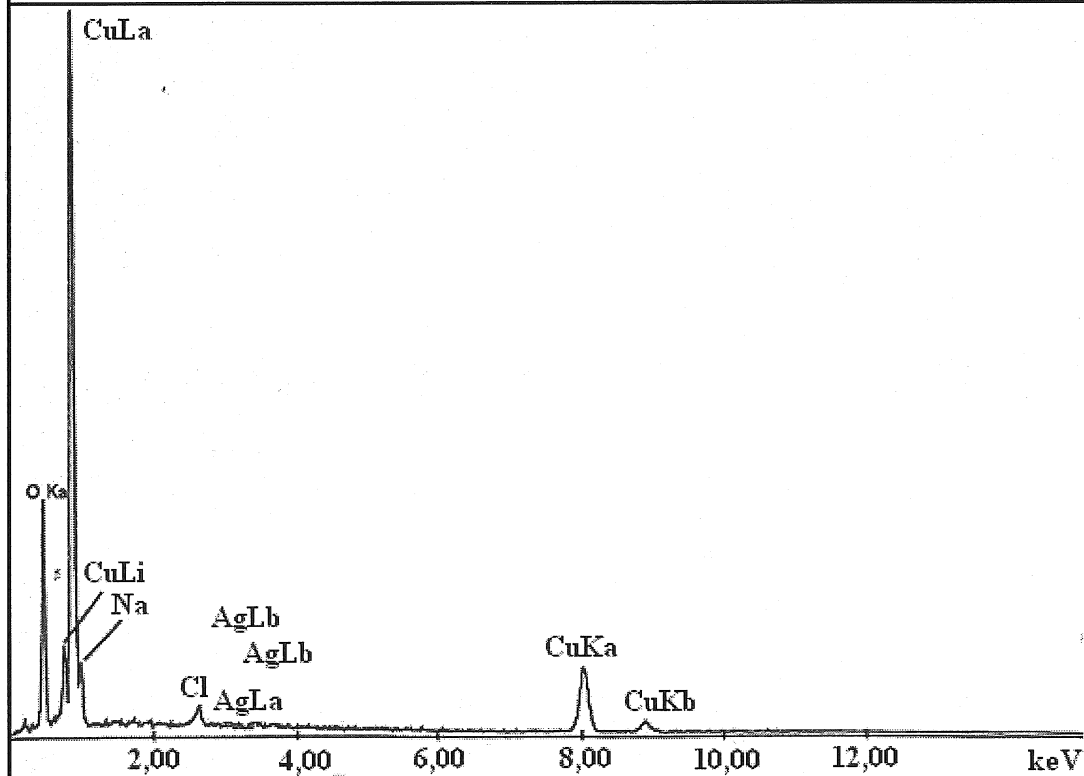


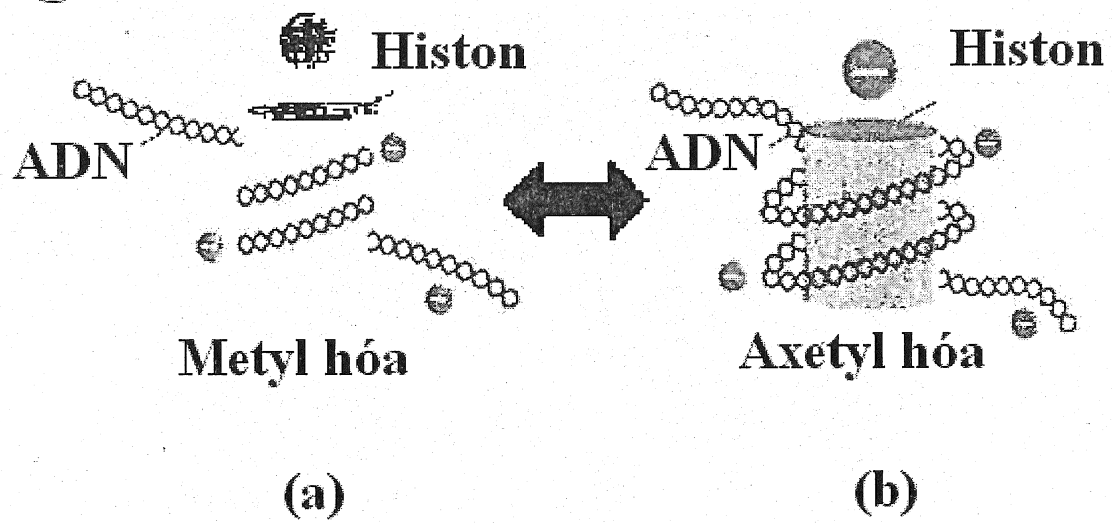
Fig.11

Fig.12

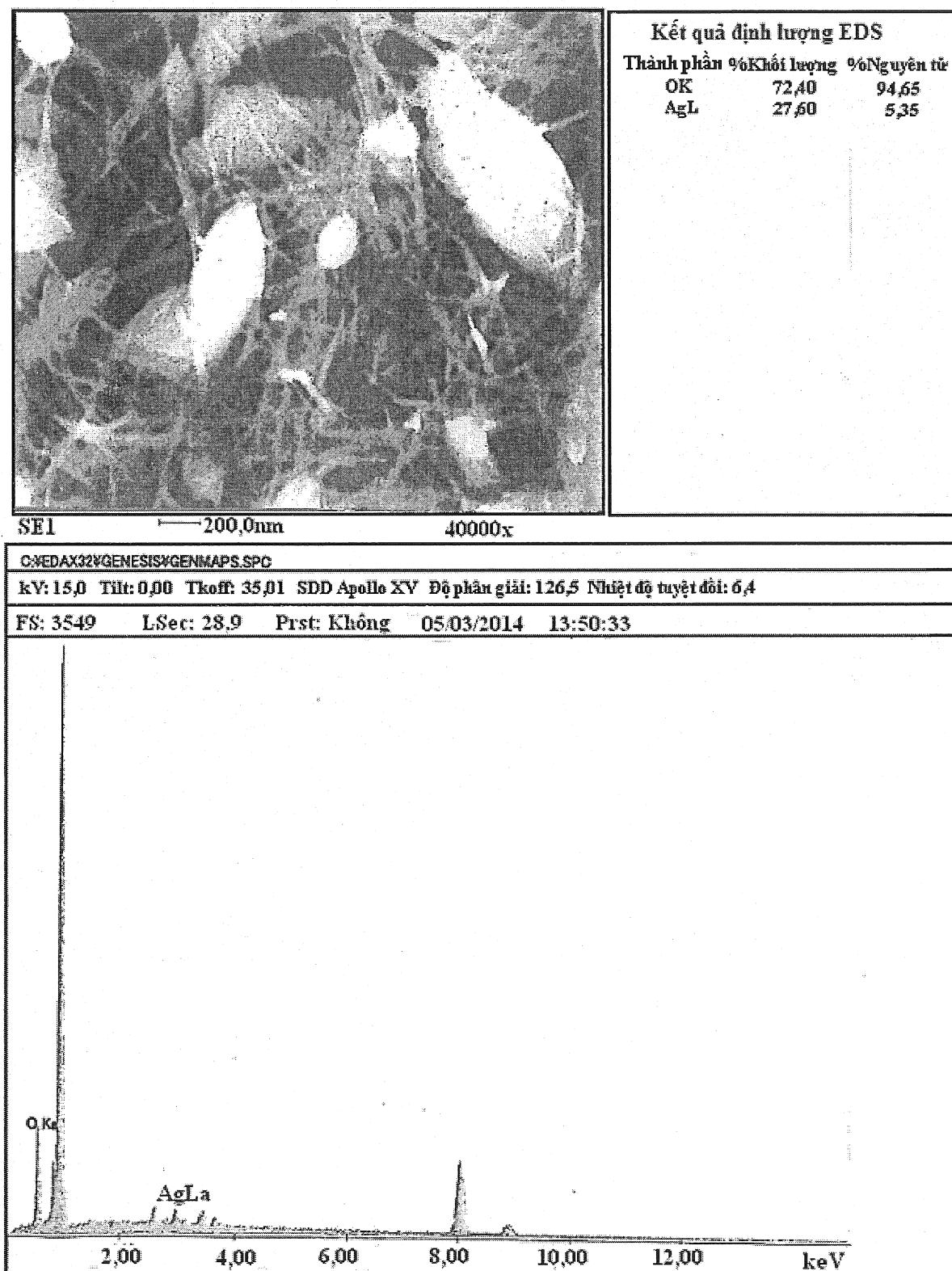


Fig.13

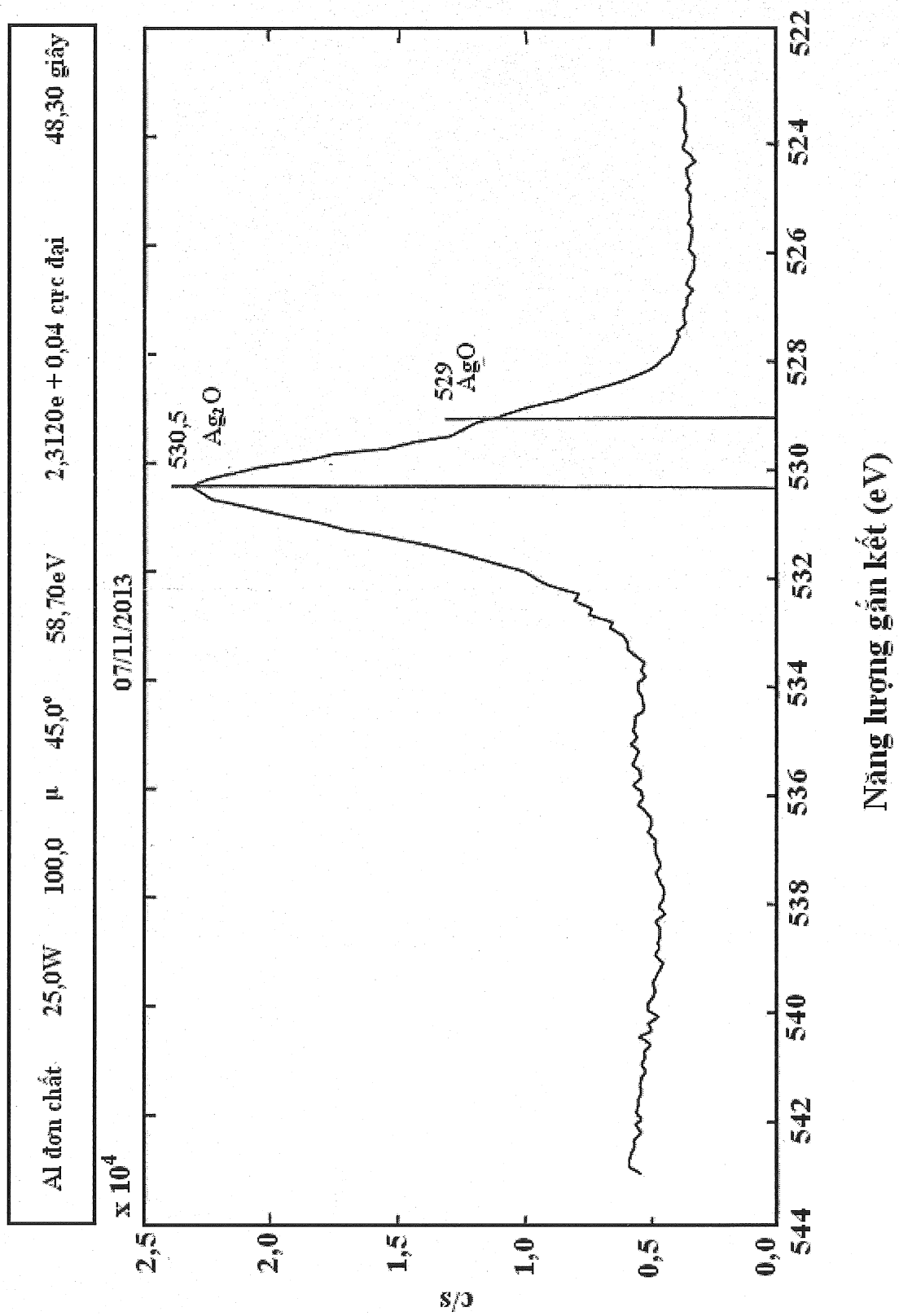


Fig.14

