

CẢM BIẾN SINH HỌC SỬ DỤNG HẠT NANO TỪ

TS CAO XUÂN HỮU

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

A BIOSENSOR EMPLOYING MAGNETIC NANOPARTICLES

Summary

Using magnetic nanoparticles as labeling agents for detecting and quantifying the level of biological molecules are of interest in many biomedical applications recently. Owing to the high biocompatibility of their surfaces, the magnetic nanoparticles have the ability to conjugate specifically to the biological molecules of interest. Because of such specific binding, the concentration of the biological agent is determined by number of magnetic nanoparticles. A sensitive magneto-biosensor using giant magneto-resistance sensing element together with a new sensing technique can determine accurately the number of the magnetic nanoparticles via a measurement of their induced magnetic field. It was demonstrated that the technique can help to detect and measure low biological concentrations in a timely fashion without the need of a special magnetic-shielding medium.

I. Mở đầu

Trong y sinh học nói chung, việc xác định hàm lượng các thực thể sinh học có sai hỏng, bị nhiễm bệnh hay có nguy cơ phá hủy cao trong một dung dịch là hết sức cần thiết. Tuy nhiên, cho tới nay các phương pháp truyền thống phục vụ đo hàm lượng các hoạt chất này thường bị giới hạn bởi rất nhiều yếu tố như độ nhạy, thời gian đo, khả năng phân tích đa chất, hay sự phản ứng khó khống chế với thành phần phức tạp của mẫu sinh học. Các phương pháp nói chung đều sử dụng một bộ chuyển đổi tín hiệu để thu nhận sự có mặt của những liên kết giữa phân tử sinh học (PTSH) và phân tử nhận biết đặc hiệu. Ở các phương pháp như ELISA [1], thu nhận lượng tử, hay sử dụng mảng kích thước micromet [2, 3], trị số đo ở lối ra của bộ chuyển đổi được xác định dựa trên tín hiệu đo màu sắc hoặc tín hiệu phát quang của mẫu. Vì thế, mức độ hấp thụ quang học hoặc khả năng tự phát quang nội tại của nhiều mẫu sinh học sẽ gây nhầm lẫn kết quả đo và tạo ra giới hạn cho các phép đo này. Tương tự như vậy, các cảm biến sinh học sử dụng phần tử nhạy là dây nano [4], ống cacbon [5], cần nâng micro [6], hay cảm biến điện hóa [7] lại dựa vào các tương tác điện tử giữa protein hoặc ADN với phần tử cảm biến. Điều này làm giảm mức độ tin cậy của các phép đo khi tiến hành với các dung dịch có độ pH hoặc nồng độ ion biến đổi.

Trong khoảng một thập niên trở lại đây, phương pháp đo hàm lượng hoạt chất sinh học sử dụng các tác nhân từ tính được quan tâm rộng rãi do tính ứng dụng thực tiễn lớn. Gần đây, các hạt nano từ tính có kích thước 5-150 nm đã được thử nghiệm và cho thấy khả năng ứng dụng to lớn của chúng trong các ứng dụng như đánh dấu sinh học, dẫn truyền thuốc, đốt nhiệt từ hay làm tác nhân tăng độ tương phản cho ảnh cộng hưởng từ [8]. Điều này có được là nhờ các liên kết hóa sinh đặc hiệu giữa các PTSH (ở thể tự nhiên hoặc nhân tạo) với các hạt nano từ [9]. Qua khảo sát cho thấy, các tín hiệu từ tính nếu có của các phần tử như protein hoặc ADN không bị cảm ứng trong từ trường ngoài, hay nói cách khác, không giao thoa với cơ chế chuyển đổi từ tính của bộ cảm biến từ. Do đó, phương pháp thu nhận và đo đạc sử dụng từ trường rất phù hợp với việc đo đạc các hàm lượng hoạt chất này trong các mẫu y sinh [10]. Ngoài đặc tính phi từ hoặc không giao thoa từ nêu trên, sự hấp dẫn của phương pháp còn thể hiện ở khả năng không phá hủy trạng thái sinh học của nhiều hệ lý sinh khác nhau [11] so với các phương pháp truyền thống khác. Hơn nữa, theo tính toán, khi các hạt nano hoặc micro từ

được gắn kết với phân tử sinh học cần quan tâm, tín hiệu từ mà chúng tạo ra sẽ làm tăng độ nhạy của bộ cảm biến lên tới hàng nghìn lần [12] so với độ nhạy đo bằng các phương pháp truyền thống. Như vậy, nếu sử dụng từ trường cảm ứng đó làm số đo hàm lượng sinh học thì các hạt nano từ đóng vai trò làm tác nhân khuếch đại tín hiệu cần đo và do đó cho phép thu nhận được những nồng độ PTSH hơn hàng nghìn lần tương ứng so với các phương pháp thông dụng hiện nay.

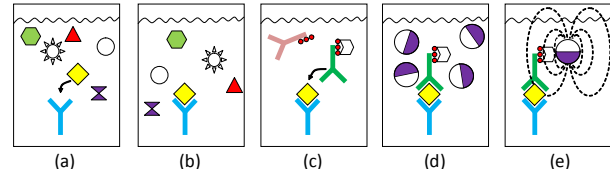
Để thu nhận, đo đạc các tác nhân sinh học như protein hoặc ADN, nhiều loại cảm biến sinh học đã được quan tâm nghiên cứu [13]. Do tính chất lưỡng cực và định xứ trong một miền nhỏ không gian xung quanh hạt của từ trường cảm ứng của các hạt nano, nên việc đo đạc cần phải tiến hành trong môi trường phi từ tính. Mặc dù vậy, trong điều kiện thực tế, từ trường trái đất luôn tồn tại, thêm vào đó là từ trường từ các nguồn khác cũng luôn ảnh hưởng tới phép đo. Đó là lý do mà cho tới nay màn chắn từ thường được sử dụng. Tuy nhiên, điểm hạn chế là phương pháp này cần chi phí lớn để xây dựng hộp/buồng chắn từ và chưa hẳn đã loại bỏ hoàn toàn từ trường trái đất hoặc từ trường tần số thấp. Điều này dẫn tới sai số ban đầu của phép đo giá trị tuyệt đối từ trường.

Để giải quyết bài toán trên, công trình này tập trung nghiên cứu một phương pháp gắn kết sinh học lên tác nhân hạt nano từ mà hiện nay đang được áp dụng rộng rãi trên thế giới kết hợp với một phương pháp đo từ mới được tìm ra bởi nhóm tác giả. Trong sự kết hợp này, các PTSH cần quan tâm được gắn lên các hạt nano từ theo một liên kết hóa sinh đặc hiệu; sau đó, số lượng các hạt nano đã tạo liên kết với các PTSH được xác định nhờ sử dụng phương pháp đo từ trường cảm ứng của các hạt nano đó đặt trong từ trường ngoài theo một nguyên lý đo từ trường phù hợp.

II. Nội dung nghiên cứu

1. Quy trình tạo liên kết hóa sinh đặc hiệu

Theo [9], liên kết đặc hiệu này bao gồm một kháng thể liên kết với thực thể sinh học cần đo đặc có mặt trong dung dịch, sau đó được tiếp tục gắn với một kháng thể thứ hai có chứa các tác nhân

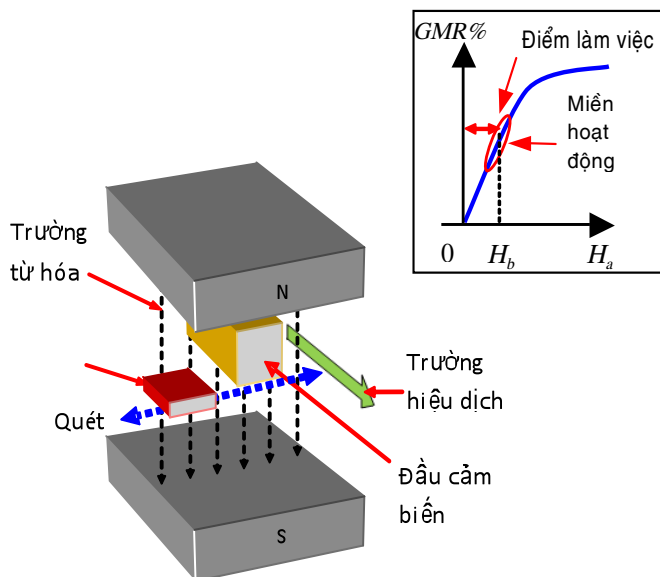


Hình 1: quy trình gắn kết PTSH với hạt nano từ [9]

phù hợp tạo ra liên kết dạng “bánh kẹp”. Các hạt nano từ được xử lý bề mặt và bọc trong một lớp chất hoạt hóa bề mặt (CHHBM) được đưa vào dung dịch và nhanh chóng “bắt” được liên kết bánh kẹp đã tạo ra. Để phục vụ đo đạc, quy trình tạo liên kết hóa sinh đặc hiệu được trình bày theo trình tự ở hình 1. Trước tiên, một kháng thể đặc trưng được gắn cố định trên một đế sinh học và tạo ra liên kết với PTSH đánh dấu (hình trám) cần quan tâm; các PTSH khác không có liên kết đặc trưng với kháng thể gắn trên đế sẽ được lọc rửa khỏi dung dịch (hình 1a-1b). Một kháng thể thứ hai có gắn biotin được đưa vào dung dịch và tạo ra liên kết bánh kẹp với kháng thể ban đầu, các kháng thể khác không tạo liên kết này được loại khỏi dung dịch (hình 1c). Sau đó các hạt nano từ đã được bọc CHHBM được đưa vào dung dịch và tự động liên kết với hai kháng thể bánh kẹp (hình 1d), các hạt nano từ còn dư không tạo liên kết được loại khỏi dung dịch. Khi mẫu hoàn thành được đặt trong một từ trường ngoài, mômen từ của các hạt nano xuất hiện và có định hướng song song trong từ trường ngoài (hình 1e). Tập thể các mômen từ của các hạt nano lúc này sẽ tạo ra một từ trường cảm ứng tổng cộng có thể đo đạc được. Từ trường cảm ứng tổng cộng này tỷ lệ với số hạt nano từ có mặt trong mẫu đo [12] và do đó, tỷ lệ với số PTSH mà các hạt nano đã gắn kết.

2. Phương pháp đo từ trường của các hạt nano từ

Trong nghiên cứu này, một phương pháp thu nhận và đo đạc tín hiệu từ siêu nhỏ mới được nghiên cứu, theo đó một cảm biến từ sử dụng phần tử nhạy làm từ vật liệu từ trở khổng lồ (GMR) được sử dụng để thu nhận từ trường nhỏ của các hạt nano từ. Hình 2 trình bày cấu hình phép đo trong đó mẫu đo được dịch chuyển qua lại (quét) trong từ trường từ hóa với tần số cố 2,0 Hz và đầu cảm biến gắn cố định trong từ trường, rất gần với bề mặt mẫu đo. Để kích hoạt phần tử cảm biến, một từ trường hiệu dụng được tạo



Hình 2: cấu hình phép đo từ trường cảm ứng của các hạt nano từ

ra nhờ một cặp nam châm điện (không thể hiện ở hình) nhằm tạo ra điểm làm việc của đầu cảm biến. Điểm làm việc này nằm trong vùng tuyến tính tốt nhất của đường đặc tuyến GMR (xem hình nhỏ ở hình 2). Với mỗi giá trị từ trường nhỏ xuất hiện xung quanh điểm làm việc, cảm biến sẽ cho tương ứng một giá trị điện trở và do đó, tương đương với một tín hiệu điện thế tại lối ra của cảm biến. Khi mẫu đo được quét qua đầu cảm biến với tần số cố 2,0 Hz, tín hiệu từ thu được trên đầu cảm biến cũng có cùng tần số. Lợi ích của phương pháp này là hệ thống chỉ cần sử dụng duy nhất một cảm biến, tín hiệu tại ngõ ra của cảm biến có tần số xác định thuận tiện cho xử lý tín hiệu, đồng thời tín hiệu được thu nhận lặp lại nhiều lần trong một thời gian đo rất ngắn, cỡ 120 lần/phút. Điều đó mang lại ý nghĩa thống kê trong đo đạc thực nghiệm, giảm thiểu sai số do các nguồn nhiễu đột ngột từ môi trường. Với phương pháp đo này, kết hợp với hệ thống xử lý nhiễu đặc biệt, độ lớn từ trường nhỏ nhất có thể đo được nằm trong dải từ $\sim$ nT đến μ T (hay $\sim 10^{-5}$ đến 10^{-3} A/m).

III. Thực nghiệm

1. Chuẩn bị hạt nano từ gắn protein

Các hạt nano từ sử dụng trong nghiên cứu này là các hạt sắt ôxyt Fe_3O_4 gồm 2 loại: có bọc và không bọc lớp SiO_2 , được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa từ hỗn hợp FeCl_2 và FeCl_3 . Nghiên

cứu đã được tiến hành trên 2 loại PTSH là protein và ADN xác định. Do nguyên tắc đo đặc được áp dụng như nhau cho các loại dung dịch sinh học khác nhau nên bài báo này chỉ trình bày nguyên tắc đo cho một loại protein xác định. Trong công trình nghiên cứu này sử dụng loại protein là enzyme protease kiểm được nhập khẩu của Công ty Sigma Ltd. (Mỹ).

Các hạt nano sắt từ có và không có lớp bọc SiO_2 được phân tán vào dung dịch đệm chứa protein (nồng độ 100 mg/ml, pH = 7,5) cho tới khi đạt nồng độ 10,8 mg/ml. Hỗn hợp được ủ qua đêm trong điều kiện rung nhẹ liên tục tại 4°C. Sau đó, lượng protein dư được lấy ra khỏi dung dịch. Các hạt nano được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS (nước muối đệm phosphate) và được dùng để xác định lượng protein đã hấp phụ trên các hạt theo phương pháp Bradford. Liên kết hạt nano - protein được tạo thêm 1 lớp bọc alginate bằng cách cho toàn bộ lượng dung dịch thu được vào 1 ml dung dịch alginate sodium (2%) và khuấy đều. Lớp bọc alginate này được tạo ra nhằm bảo vệ liên kết hạt nano và protein khỏi ảnh hưởng của môi trường như độ pH hoặc nhiệt độ. Hỗn hợp alginate chứa hạt nano - protein được đưa dần vào dung dịch CaCl_2 (0,2M) và rung nhẹ liên tục tại 4°C để tạo hạt. Các hạt tạo thành được rửa 3 lần với dung dịch NaCl (0,9%) và lưu giữ trong dung dịch NaCl (0,9%) ở 4°C.

2. Các phép đo từ

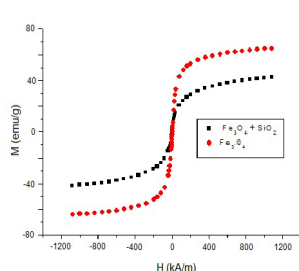
Cảm biến từ trường sử dụng phần tử nhạy làm từ vật liệu từ trở khổng lồ (GMR) để thu nhận từ trường cảm ứng rất nhỏ của các hạt nano từ trong từ trường từ hóa. Để tạo ra điểm làm việc của đầu cảm biến, một từ trường đều hiệu dịch theo phương ngang dọc theo trục cảm biến được tạo ra nhờ sử dụng cặp cuộn dây nam châm điện thiết kế theo cấu hình cuộn Helmholtz vuông, có cường độ phù hợp và ổn định trong dải 10-30 Oe, hay 800-2.400 A/m. Hạt nano từ trong mẫu đo được từ hóa nhờ một từ trường từ hóa có cường độ 3,2 kOe hay 254,8 kA/m, đặt theo phương thẳng đứng (vuông góc với trục cảm biến).

Để tránh tiếp xúc giữa mẫu sinh học với phần tử nhạy của cảm biến, một lớp thủy tinh mỏng 120

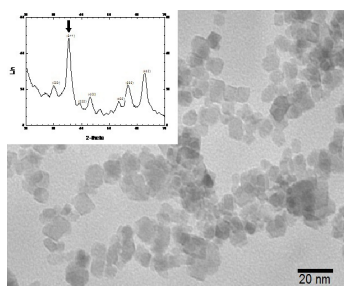
µm được đặt ngay trên bề mặt của mẫu đo. Khoảng cách từ mẫu dịch chuyển tới bề mặt cảm biến cố định đặt phía trên mẫu có giá trị xấp xỉ 0,5 mm. Mẫu đo được dịch chuyển qua lại so với đầu cảm biến tại tần số 2,0 Hz với biên độ dịch chuyển 5,0 mm.

IV. Kết quả và thảo luận

Hai loại hạt nano từ, có và không có lớp bọc SiO_2 đã được tổng hợp chế tạo. Phép đo từ độ kiểm chứng tính chất từ của các hạt nano được thực hiện trên thiết bị từ kế mẫu rung VSM-DMS880 cho thấy tính chất siêu thuận từ đặc trưng của các hạt nano từ (hình 3).



Hình 3: đường cong từ độ đo tại nhiệt độ phòng cho hai mẫu có bọc SiO_2 và không bọc SiO_2



Hình 4: ảnh TEM của các hạt nano từ. Hình nhỏ chỉ ra hình ảnh phổ nhiễu xạ tia X của mẫu tương ứng

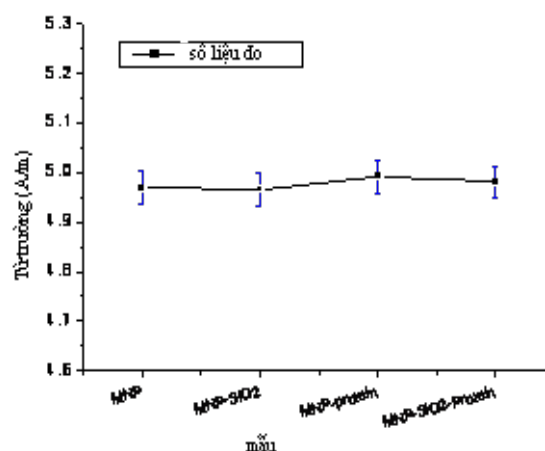
Hình 4 trình bày một ảnh hiển vi điện tử quét (TEM) thu được khi chụp các hạt nano từ đã chế tạo cho loại có bọc SiO_2 . Có thể đánh giá kích thước hạt nằm trong dải từ 8-12 nm. Hình nhỏ trên hình 4 trình bày phổ nhiễu xạ tia X của một mẫu hạt trong đó thấy rõ đỉnh nhiễu xạ (311) tại góc $2\theta \approx 36^\circ$ (có dấu mũi tên) có bề rộng mà theo tính toán bán thực nghiệm theo công thức Scherrer [14] cho kích thước hạt bằng 8,8 nm.

Bảng 1: hàm lượng protein hấp phụ trên các hạt nano có hoặc không có SiO_2

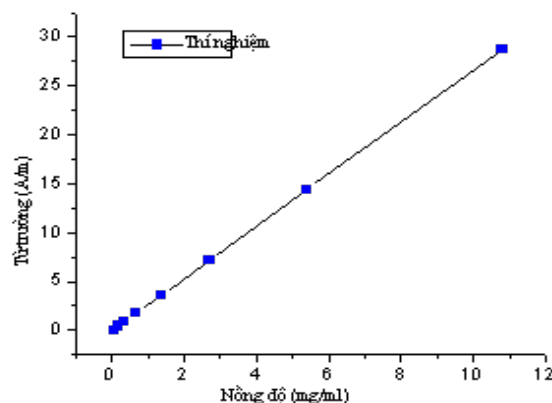
Sample	Dilution	1:2	1:4	1:6
$\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{SiO}_2 + \text{protein}$	(*) Abs.	-	0.566491	0.455988
	Conc. (mg/ml)	-	0.482953	0.242054
	Sample conc. (mg/ml)		1.931799	1.936435
$\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{protein}$	Abs.	0.527503	0.43912	-
	Conc. (mg/ml)	0.397957	0.205265	-
	Sample conc. (mg/ml)	0.795915	0.82106	

(*) Abs.: hấp phụ; Conc.: hàm lượng

Sau khi được ủ qua đêm, các hạt nano được rửa sạch và phân tán vào dung dịch NaOH 1N. Một dải mẫu với nồng độ pha loãng của các hạt thu được trong NaOH 1N với các tỷ lệ 1:2, 1:4, 1:8 được tạo ra để xác định hàm lượng protein hấp phụ trên các hạt nano. Bảng 1 trình bày hàm lượng protein hấp phụ trên hạt nano có và không có lớp bọc SiO_2 . Dung dịch pha loãng BSA (bovine serum albumin) với dải nồng độ từ 0-0,7 mg trong 1 ml NaOH 1N có chứa 10,8 mg hạt nano từ đã được sử dụng để tạo ra đường chuẩn trong phương pháp Bradford, theo đó, phương trình đường chuẩn thực nghiệm thu



Hình 5: bốn mẫu với cùng hàm lượng hạt nano ban đầu (MNP: hạt nano không bọc SiO_2 , MNP - SiO_2 : hạt nano có bọc SiO_2 , MNP - protein: hạt nano có gắn protein, MNP - SiO_2 - protein: hạt nano có bọc SiO_2 có gắn protein)



Hình 6: đường chuẩn tín hiệu từ tính xác định bằng thực nghiệm

được: $y = 2.180x - 0,752$, hệ số khớp $R^2 = 0,997$. Kết quả này cho thấy, lớp bọc SiO_2 làm tăng độ kết dính của liên kết hạt nano - protein, phù hợp với các công bố trước đây, điển hình như nhóm Chang [15] hay [16].

Nhằm khẳng định tính đúng đắn của phương pháp sử dụng tác nhân từ tính trong đo đặc hàm lượng protein hoặc ADN, nghiên cứu này đã tiến hành đo đặc kiểm tra và so sánh kết quả đo giữa 4 mẫu có cùng lượng hạt nano ban đầu, trong đó 2 mẫu hạt nguyên thủy có bọc và không bọc SiO_2 , hai mẫu còn lại là 2 mẫu ban đầu có gắn thêm các protein (cả 4 mẫu này được thiết lập cùng một chế độ đo như nhau). Kết quả thu được cho thấy hầu như không có sự khác biệt nào giữa 4 kết quả đo từ của 4 mẫu (hình 5). Sự sai khác nhỏ trong kết quả thực chất là do sự chênh lệch từ độ của các mẫu ban đầu với mẫu không bọc SiO_2 có từ độ lớn hơn so với mẫu có bọc SiO_2 , như đã chỉ ra ở hình 3. Hình 5 cũng chỉ ra các thanh hạn mức biểu diễn sai số của phép đo, cụ thể là cỡ 10^{-3} A/m của phép đo từ. Những kết quả ban đầu đo đặc trên lượng mẫu tương đối lớn cho thấy mức tuyến tính rất cao của phép đo hàm lượng. Hình 6 trình bày kết quả xác định đường chuẩn tín hiệu từ tính thực hiện trên 8 mẫu có nồng độ tuyến tính theo lũy thừa bậc 2. Từ trường cảm ứng của các hạt nano từ nằm trong dải độ lớn từ 10^{-4} -10 A/m và có thể được thu nhận và đo đặc bởi duy nhất một cảm biến GMR kết hợp với hệ thống quét tín hiệu ổn định.

V. Kết luận

Bài báo trình bày một phương pháp mới xác định hàm lượng các PTSH và các kết quả nghiên cứu ban đầu về một cảm biến sinh học sử dụng phương pháp này với tác nhân là hạt nano từ. Các hạt nano từ là các hạt Fe_3O_4 được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa có kích thước 8-12 nm. Quy trình gắn kết hạt nano với các PTSH cần đo đặc được thực hiện theo quy trình chuẩn đã biết. Kỹ thuật đo từ được đề xuất nghiên cứu và cho kết quả hết sức khả quan. Các kết quả ban đầu của các phép đo từ đã khẳng định tính đúng đắn của phương pháp đo và các kết quả sẽ được cải tiến khi hệ thống tiếp tục được nghiên cứu hoàn thiện và khi quá trình tối ưu hóa được thực hiện ■

Tài liệu tham khảo

- [1] Engvall E, Perlman P. "Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8 (9): 871-4 (1971).
- [2] Mitchell P. A perspective on protein microarrays. *Nat. Biotechnol.* 20, 225-229 (2002).
- [3] Chan S.M. et al. Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nat. Med.* 10, 1390- 1396 (2004).
- [4] Zheng G. et al. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat. Biotechnol.* 23, 1294-1301 (2005).
- [5] Ghosh S., Sood A.K. & Kumar N. Carbon nanotube flow sensors. *Science* 299, 1042-1044 (2003).
- [6] Ji H. et al. Microcantilever biosensors based on conformational change of proteins. *Analyst* 133, 434-443 (2008).
- [7] Drummond T.G., Hill M.G. & Barton J.K. Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* 21, 1192-1199 (2003).
- [8] Berry C.C., Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D* 42: 224,003 (2009).
- [9] Ilia Fishbein and Robert J. Levy. The matrix neutralized, *Nature - Analytical Chemistry*, 461, 890 (2009).
- [10] C.R. Tamanaha, S.P. Mulvaney, J.C. Rife, L.J. Whitman. Magnetic labeling, detection, and system integration, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 1-13 (2008).
- [11] L.A. Bradshaw, A. Myers, W.O. Richards, W. Drake, J.P. Wikswo. Vector projection of biomagnetic Fields, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 43, 85 (2005).
- [12] Gaster R.S. et al. "Matrix - insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine", *Nature Medicine*, doi:10.1038/nm2032 (2009).
- [13] J. Llandro J.J. Palfreyman, A. Ionescu, C.H.W. Barnes. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review, *Med Biol Eng Comput*, 48:977-998, DOI 10.1007/s11517-010-0649-3 (2010).
- [14] Patterson A.L. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination, *Physical Review*, 56, 978-982 (1939).
- [15] Jin Zhang et al. "Design nanoparticles as Drug carriers for cancer therapy", *Cancer genomics and proteomics review*, 3, 147-158 (2006).
- [16] Hui Yao, Nan Li, Shu Xu, Jin-Zhong Xu, Jun-Jie Zh, Hong-Yuan Chen. "Electrochemical study of a new methylene blue/siliconoxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide", *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 372-377 (2005).