

Thiết bị chẩn đoán ung thư mới dựa trên liên kết từ - sinh học

Cao Xuân Hữu^{1*}, Đặng Đức Long², Lê Lý Thùy Trâm³, Đoàn Văn Long⁴

¹Khoa Điện tử viễn thông, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

²Viện Nghiên cứu Việt - Anh, Đại học Đà Nẵng

³Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

⁴Trung tâm Nghiên cứu điện tử, tin học, tự động hóa miền Trung

Ngày nhận bài 3.9.2015, ngày chuyển phản biện 14.9.2015, ngày nhận phản biện 12.10.2015, ngày chấp nhận đăng 30.10.2015

Các phương pháp chẩn đoán ung thư hiện nay đều dựa trên nguyên tắc gắn kết đặc hiệu giữa kháng nguyên với tác nhân đo đạc là các phần tử phát quang để xác định nồng độ kháng nguyên dựa trên phổ màu tương ứng thu được. Trong nghiên cứu của nhóm tác giả, thiết bị chẩn đoán được chế tạo dựa trên nguyên tắc hoạt động mới, sử dụng tác nhân đo đạc là các hạt nano từ với phép đo từ trường cảm ứng của các hạt này khi có gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để xác định nồng độ kháng nguyên. Bài báo giới thiệu tổng quan về thiết bị mới được nghiên cứu phát triển, cũng như những yếu tố đặc thù liên quan tới phương pháp đo và kỹ thuật thu nhận tín hiệu.

Từ khóa: cảm biến từ GMR, hạt nano từ, thiết bị chẩn đoán ung thư.

Chỉ số phân loại 2.6

A cancer diagnostic instrument based on magnetobiological links

Summary

A cancer diagnostic instrument based on a new detection method has been investigated and developed by the research group. In current immunological diagnosis tests, specific binding between cancer antigens and sensing agents creates particular optical signals which correlate with the concentration of the antigens. These tests are affected greatly by the medium conditions of the cancer samples. The instrument developed here uses a new kind of sensing agent, magnetic nano-particles in order to overcome the limitations of the immunological methods in measuring the antigen's concentration by means of induced magnetic signals of nano-particles binded specifically with the antigens. This paper presents an overview of the instrument and its novel points related to measuring method and detecting technique.

Keywords: cancer diagnostic instrument, GMR sensor, magnetic nano-particles.

Classification number 2.6

Đặt vấn đề

Ung thư đang là mối đe dọa đối với tất cả các quốc gia, trong đó có Việt Nam, bởi đây là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Tuy nhiên, bệnh này có thể chữa khỏi hoặc kéo dài thời gian sống nếu được phát hiện sớm và điều trị kịp thời. Do đó, chẩn đoán ung thư trở thành một trong những nhu cầu phổ biến và hết sức cấp thiết hiện nay, việc phát hiện sớm căn bệnh này là một trong những yếu tố quan trọng giúp hạn chế được mức độ tử vong. Mỗi bệnh ung thư đều có một hoặc một vài loại kháng nguyên đặc hiệu đại diện cho bệnh đó. Hiện nay, hầu hết các phương pháp xác định ung thư đều dựa trên nguyên tắc gắn kết đặc hiệu giữa kháng nguyên ung thư và một tác nhân chuyển đổi (cơ chất) để dễ dàng phát hiện ra chúng thông qua các phép đo. Một trong những phương pháp phổ biến nhất đang được áp dụng ở hầu hết các phòng xét nghiệm, cơ sở y tế là phương pháp “Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme”, hay ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [1]. Kỹ thuật ELISA bao gồm 3 thành phần tham gia phản ứng: kháng nguyên, kháng thể và chất tạo màu. Nguyên lý chính của phương pháp này là sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzyme để khi cho thêm vào phản ứng cơ chất thích hợp (thường là *nitrophenol phosphate*) thì enzyme sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Từ đó, giúp định lượng nồng độ kháng nguyên hay kháng thể cần phát hiện thông

*Tác giả liên hệ: Email: huucaoxuan@gmail.com

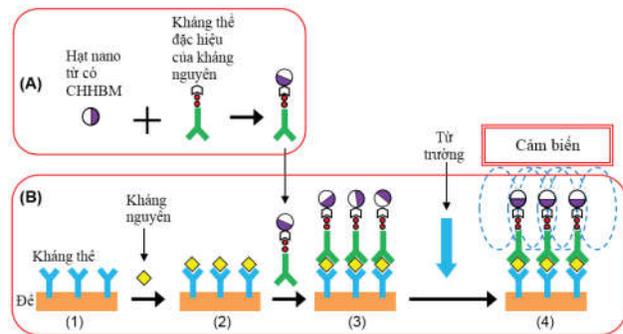
qua cường độ màu thu được. Phương pháp này được thiết kế cho việc phát hiện và định lượng vật chất như peptides, protein, kháng thể, hormone... Đây là một kỹ thuật khá nhạy và đơn giản, cho phép xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở một nồng độ rất thấp (khoảng 0,1 ng/ml). So với kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA - Radio immuno assay) [2] thì kỹ thuật này có chi phí thấp hơn và an toàn hơn mà vẫn đảm bảo độ chính xác như nhau.

Gần đây, cùng với sự tiến bộ trong nghiên cứu vật liệu mới, hiệu ứng từ trở khổng lồ - GMR (Giant Magneto-Resistance) được phát hiện và đã đoạt giải Nobel vật lý năm 2007 [3]. Dựa trên hiệu ứng này, một loại cảm biến từ siêu nhạy có tên là *cảm biến GMR* đã được nghiên cứu phát triển, cho phép thu nhận được từ trường siêu nhỏ của các lưỡng cực từ. Khả năng thu nhận từ trường của cảm biến trong dải rất rộng, từ 10^{-9} T (nano tesla) đến 10^{-3} T (mili tesla), và từ trường thu nhận được nhỏ hơn từ trường trái đất từ 10 đến hàng trăm ngàn lần. Phát hiện này mở ra một lĩnh vực mới - cảm biến từ siêu nhạy [4] (năm 2009), có thể áp dụng trong đo đặc tính hiệu ứng sinh. Tiếp cận xu hướng này, từ năm 2011 chúng tôi đã tập trung nghiên cứu tìm ra một kỹ thuật đo phù hợp nhằm khai thác và sử dụng những đặc tính nổi trội của cảm biến từ GMR cùng những ưu việt của phương pháp ELISA vào việc đo lường y sinh [5, 6]. Bài báo này trình bày tổng quan về thiết bị chẩn đoán ung thư sử dụng cảm biến từ GMR ở quy mô phòng thí nghiệm do nhóm nghiên cứu thiết kế chế tạo và thử nghiệm.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

Trong nghiên cứu này, tác nhân đo đặc là các hạt nano từ Fe_3O_4 đã được chế tạo với kích thước từ 8 đến 12 nm, tương đương với kích thước của đối tượng sinh học cần đo đặc là các kháng nguyên đặc hiệu PSA của bệnh ung thư tuyến tiền liệt và kháng nguyên CA15-3 của bệnh ung thư vú. Quy trình gắn kết ELISA áp dụng trong nghiên cứu này là quy trình tạo liên kết có dạng “bánh kẹp” (hình 1) [7], gồm 2 bước: chuẩn bị kit đặc hiệu (A) và gắn kết với mẫu bệnh (B). Trong đó, ở bước (A), hạt nano từ được bọc một lớp chất hoạt hóa bề mặt thích hợp (CHHBM) để gắn kết với một kháng thể có liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cần xác định có trong mẫu bệnh. Kit đặc hiệu này được chuẩn bị sẵn với số lượng lớn. Ở bước (B), kháng thể bậc một được gắn dư lên đế sinh học, sau đó một lượng mẫu

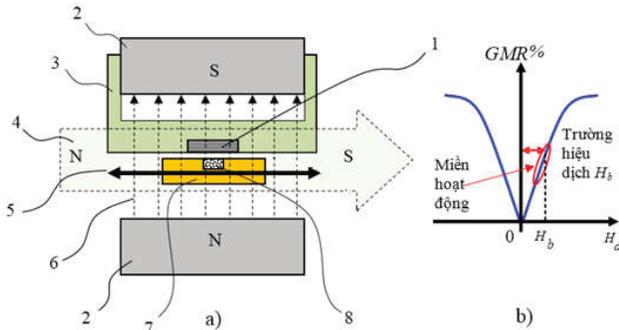
bệnh phẩm có chứa kháng nguyên bệnh (hình trám) được đưa vào và tạo liên kết đặc hiệu với kháng thể trên đế, các thành phần khác của mẫu bệnh phẩm được loại khỏi dung dịch. Từ đây, kit đặc hiệu đã chuẩn bị sẵn trong bước (A) được đưa vào dung dịch và nhanh chóng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên gắn kháng thể bậc một trên đế trong dung dịch, do đó hình thành cấu trúc “bánh kẹp” - kháng nguyên nằm ở giữa 2 kháng thể. Lượng kit đặc hiệu dư được loại khỏi dung dịch, số hạt từ tính còn lại chính là số các hạt từ có liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Lượng hạt này tỷ lệ thuận với từ trường cảm ứng mà chúng tạo ra khi được đặt trong một từ trường từ hóa. Do đó, việc xác định số lượng hạt nano từ có gắn kháng nguyên được thực hiện thông qua phép đo từ trường cảm ứng của các hạt nano từ nhờ cảm biến từ GMR. Thiết bị nghiên cứu theo phương pháp mới này cần đáp ứng độ nhạy tối thiểu tương đương với thiết bị chẩn đoán theo phương pháp ELISA truyền thống.



Hình 1: quy trình gắn kết đặc hiệu dạng “bánh kẹp”:
[kháng thể và hạt nano từ] - [kháng nguyên] -
[kháng thể trên đế] để tạo mẫu đo từ - sinh học
(A) là bước chuẩn bị kit đặc hiệu, (B) là bước gắn kết trực tiếp với mẫu bệnh

Hệ đo được xây dựng theo sơ đồ nguyên lý trên hình 2a. Cảm biến (1) được đặt cố định trong từ trường ngoài (6) tạo bởi cặp nam châm (2). Một từ trường hiệu dịch H_b (4) kích hoạt cảm biến hoạt động trong vùng tuyến tính của đường đặc tuyến cảm biến (hình 2b). Mẫu đo (8) có chứa các hạt nano từ được dịch chuyển qua bề mặt cảm biến theo phương (5) ở tần số 3 Hz. Do cơ cấu dịch chuyển này, các hạt nano từ được từ hóa trong từ trường (6) và phát sinh từ trường cảm ứng nằm trong dải 1 nT đến 10 μ T. Đế cảm biến thu nhận được từ trường siêu nhỏ này, một kỹ thuật loại nhiễu chọn lọc đặc biệt đã được nghiên cứu phát triển. Với tần số quét mẫu thiết lập ở 3 Hz, kỹ thuật loại nhiễu này đã được nghiên cứu tập trung cho vùng tần số từ 3-50 Hz, trong đó nhiễu tần số thấp (< 3 Hz), nhiễu tần số cao (>50 Hz) và nhiễu cơ học được loại bỏ

triệt để. Kỹ thuật này được hình thành dựa trên sự kết hợp giữa thể mạnh của những module (toolkit) sẵn có trong phần mềm LabVIEW với tốc độ lấy mẫu lớn của bộ chuyển đổi ADC (analog-digital converter).



Hình 2: (a) sơ đồ nguyên lý đo đặc sử dụng cảm biến GMR, (b) nguyên tắc lấy tín hiệu dựa trên đường đặc tuyến cảm biến
 (1) - Cảm biến, (2) - Cặp nam châm, (3) - Giá cảm biến, (4) - Từ trường hiệu dịch, (5) - Phương quét mẫu, (6) - Từ trường từ hóa, (7) - Khay mẫu, (8) - Mẫu đo từ - sinh học

Kết quả và bàn luận

Hình ảnh thiết bị dưới dạng mẫu thử nghiệm và các thông số chính được trình bày trên hình 3. Thiết bị làm việc dựa vào một phần mềm điều khiển hệ thống và xử lý tín hiệu xây dựng trên nền LabVIEW.



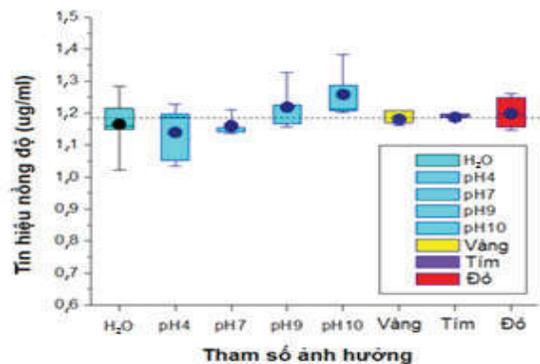
Thông số thiết bị:

- Dải đo thử nghiệm: 5 ng/ml - 10 mg/ml
- Nhiệt độ hoạt động: 15-40°C
- Thời gian đo: 1-3 phút
- Lượng mẫu: 2-10 µl
- Công suất tiêu thụ: 150 W
- Nguồn nuôi: 220 V, 50 Hz
- Phần mềm: CanDec-15
- Thiết bị có thể kết nối mạng hoặc làm việc độc lập

Hình 3: hình ảnh mẫu thử nghiệm (prototype) của thiết bị chẩn đoán ung thư sử dụng hạt nano từ làm tác nhân đo đặc và các thông số chính của thiết bị

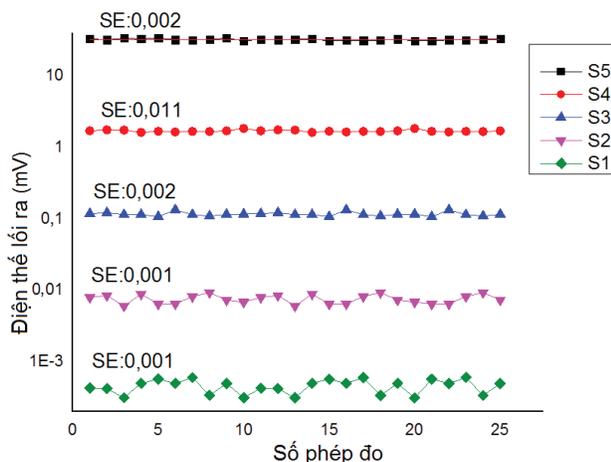
Để đánh giá khả năng hoạt động của thiết bị về độ nhạy và dải đo, chúng tôi so sánh các đường chuẩn hóa của thiết bị với thiết bị hiện có là ELISA. Trong cả hai phép phân tích sử dụng thiết bị ELISA và thiết bị nghiên cứu, chúng tôi sử dụng cùng một loại cơ chất và kháng thể liên kết đặc hiệu. Kết quả thu được cho thấy, khả năng thu nhận protein của thiết bị có thể đạt tới mức 10^{-12} mol, tức là ở mức pico-mol. Hơn nữa, một phép kiểm tra dữ liệu thực nghiệm cũng cho thấy, thiết bị có đường chuẩn dạng tuyến tính (tính theo dải log-log) trong một dải lớn tới 6 bậc về độ lớn.

Có thể kể tới các phương pháp đo đặc hàm lượng các hoạt chất sinh học khác đã và đang được nghiên cứu phát triển trong những năm gần đây, như: dây nano [8, 9], ống cacbon nano [10], cần nâng micro [11], hay cảm biến điện hóa [12]. Những phương pháp này dựa vào các tương tác điện tử giữa các phân tử sinh học với cảm biến để xác định nồng độ các phân tử sinh học. Do đó, khi tiến hành đánh giá các mẫu dung dịch có độ pH thay đổi, nhiệt độ thay đổi hoặc có các phản ứng giàu ion phát sinh sẽ cho kết quả ít tin cậy. Các phương pháp như ELISA [1], mảng protein [13] hay chấm lượng tử [14] lại có cơ chế thu nhận tín hiệu phụ thuộc vào cường độ phát xạ màu khi đưa vào mẫu đo một cơ chất phát quang phù hợp. Như vậy, khi đo đặc với các mẫu sinh học có khả năng tự phát quang hoặc mẫu bị vẩn đục, kết quả thu được sẽ bị ảnh hưởng, dẫn tới sai số đáng kể. Phương pháp đo hàm lượng hoạt chất thông qua từ trường cảm ứng của các hạt nano từ trong nghiên cứu này không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố nêu trên. Việc khảo sát ảnh hưởng của độ pH (hay nồng độ ion), độ màu đặc trưng của dung môi được chỉ ra trên hình 4 với việc đo lặp lại cùng một lượng hạt nano từ Fe_3O_4 trong các dung môi là nước cất (H_2O), dung môi có độ pH bằng 4, 7, 9, 10 và dung môi có màu vàng, tím, đỏ khác nhau. Với độ lệch về giá trị đo so với đường trung bình (đường nét đứt) nhỏ hơn 5%, có thể khẳng định các tham số thay đổi về độ pH và màu sắc dung môi không làm ảnh hưởng tới tín hiệu đo từ.



Hình 4: kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH và màu sắc của dung môi lên tín hiệu đo (tại mỗi điểm thực nghiệm, chấm tròn là giá trị trung bình trong dải số liệu giới hạn bởi 2 thanh ngang)

Thiết bị nghiên cứu cũng được đánh giá khả năng lặp lại và mức độ tin cậy dựa trên sự lặp lại phép đo trên các mẫu chuẩn khác nhau, đồng thời so sánh với thiết bị ELISA trên cùng mẫu đo và thời điểm tiến hành. Hình 5 trình bày mức độ lặp lại của các phép đo sau 25 lần đo tiến hành trên 5 mẫu chuẩn khác nhau. Sai số chuẩn (SE) so với giá trị hàm lượng trung bình của mỗi mẫu có giá trị trong dải từ 0,001-0,011 cho cả 5 mẫu ở 5 nồng độ khác nhau. Những giá trị này cho thấy độ tin cậy về mặt thu nhận tín hiệu và đảm bảo tốt độ phân giải của các phép đo ở các vùng nồng độ khác nhau.



Hình 5: dữ liệu kiểm tra tính lặp lại của thiết bị đo đối với 5 mẫu ở các nồng độ khác nhau

Qua quá trình nghiên cứu thiết kế và chế tạo thiết bị còn cho thấy một số thông số và đặc điểm nổi trội hơn so với thiết bị ELISA truyền thống như:

- Mạch điện tử và hệ cơ khí của thiết bị không phức tạp, giúp giảm chi phí chế tạo hệ đo.
- Thiết bị dễ vận hành, phép đo được thao tác dễ dàng, cho kết quả nhanh với độ tin cậy cao và chi phí thấp.

Kết luận

Thiết bị sử dụng cảm biến GMR hoạt động dựa trên nguyên tắc đo nồng độ hạt nano từ có gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên bệnh ung thư đã được nghiên cứu chế tạo bởi nhóm nghiên cứu trong nước. Thiết bị sử dụng từ trường cảm ứng của hạt nano từ làm đại lượng

vật lý cần đo. Kết quả định lượng mẫu sinh học không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố phát sinh từ mẫu đo như: độ pH, môi trường giàu ion, khả năng tự phát quang hay bị vẩn đục. Kết quả này xuất phát từ sự làm chủ kỹ thuật đo đạc, công nghệ chế tạo hạt nano từ tính, công nghệ chế tạo thiết bị, quy trình gắn kết đặc hiệu, công nghệ chế tạo kit sinh học và khả năng khai thác những ưu điểm để sử dụng từ phần mềm sẵn có. Có thể kết luận rằng, nghiên cứu này đã cung cấp một cách tiếp cận mới và chủ động trong lĩnh vực đo đạc phân tích y sinh nói chung và trong chẩn đoán y tế nói riêng.

Tài liệu tham khảo

[1] Engvall E, Perlman P (1971), "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G", *Immunochemistry*, **8**(9), pp.871-874.

[2] Patrono C, Peskar B.A (1987), *Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology*, Heidelberg Springer-Verlag.

[3] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2007/press.html.

[4] Gaster R.S, et al (2009), "Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine", *Nature Medicine*, **15**, doi:10.1038/nm.2032.

[5] Cao Xuân Hữu (2011), *Báo cáo tổng kết đề tài cấp Đại học Đà Nẵng*, mã số Đ2011-02-10.

[6] Cao Xuân Hữu (2012), *Báo cáo tổng kết đề tài tiềm năng*, mã số KC03.TN10/11-15.

[7] Cao Xuân Hữu (2013), "Cảm biến sinh học sử dụng hạt nano từ", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **6**(649), tr.50-54.

[8] Chan S.M, et al (2004), "Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways", *Nat. Med*, **10**, pp.1390-1396.

[9] Zheng G, et al (2005), "Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays", *Nat. Biotechnol*, **23**, pp.1294-1301.

[10] Ghosh S, Sood A.K, Kumar N (2003), "Carbon nanotube flow sensors", *Science*, **299**, pp.1042-1044.

[11] Ji H, et al (2008), "Microcantilever biosensors based on conformational change of proteins", *Analyst*, **133**, pp.434-443.

[12] Drummond T.G, Hill M.G, Barton J.K (2003), "Electrochemical DNA sensors", *Nat. Biotechnol*, **21**, pp.1192-1199.

[13] Mitchell P (2002), "A perspective on protein microarrays", *Nat. Biotechnol*, **20**, pp.225-229.

[14] Shingyoji M, et al (2005), "Quantum dots-based reverse phase protein microarray", *Talanta*, **67**, pp.472-478.