

CỐ ĐỊNH KHÁNG THỂ IgM KHÁNG VI RÚT BẰNG PHƯƠNG PHÁP CỘNG HÓA TRỊ CHO CẢM BIẾN MIỄN DỊCH ĐIỆN HÓA

Trần Quang Huy^{1,2}, Nguyễn Thị Hồng Hạnh¹, Phạm Văn Chung¹, Phan Thị Nga¹, Mai Anh Tuấn²

¹Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

²Viện Đào tạo quốc tế về Khoa học vật liệu, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Đến Tòa soạn 19-5-2010

Abstract

In this study, we describe the immobilization methods of IgM antibody against Japanese Encephalitis (JE) virus for electrochemical immunosensors. These methods were experimented in order to optimize the efficiency, orientation of antibody as well as minimize the loss of its activity on the sensor surface over the time. Atomic force microscope, Fourier transform infrared spectrometer and fluorescence microscope were performed to survey the characterizations of the sensor surface after using different immobilizing methods of the antibody. The results showed that the silanized sensors using 5% glutaraldehyde as a cross linker between IgM antibody and 3-aminopropyl-triethoxy-silane (APTES) layer is the most advantageous method for electrochemical immunosensors application, it revealed that the signal detection is 2 to 3 fold higher than the use of other methods. The detection of immunosensors was sensitive, with the quick response time, about 5 minutes and stability after 20 minutes for the detection of JE viral antigens in the sample diluted 60 times in comparison with the initial dilution used for MAC-ELISA tests.

Keywords: Covalent immobilization, IgM antibody, IEV antigens, immunosensor, biosensor.

1. MỞ ĐẦU

Cảm biến miễn dịch là cảm biến sinh học được phát triển trên cơ sở tính đặc hiệu của phản ứng kháng nguyên – kháng thể của các đối tượng sinh học. Trong đó, một trong hai phần tử kháng nguyên hoặc kháng thể được cố định trên bộ chuyển đổi tín hiệu thích hợp làm phần tử dò, phần tử còn lại là đối tượng được dò tìm trong mẫu phân tích. Dựa theo nguyên lý dò tìm, cảm biến miễn dịch được phân thành các loại khác nhau như cảm biến điện hóa, quang học, từ hay khối lượng [1, 2]. Với những ưu điểm nổi bật của cảm biến miễn dịch như khả năng phát hiện nhanh tại chỗ, độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chọn lọc cao, kích thước cảm biến nhỏ gọn, tiện dụng, lượng mẫu cần phân tích có nồng độ thấp, không cần chất đánh dấu, chi phí cho sinh phẩm và hóa chất không cao như một số kit chẩn đoán khác, cảm biến miễn dịch ngày càng thu hút được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu và phát triển ứng dụng trong việc dò tìm mầm bệnh [1]. Olivier Lazcka và một số tác giả cho rằng cảm biến sinh học, trong đó có cảm biến miễn dịch có triển vọng to lớn để thay thế một phần hay hoàn toàn các phương pháp chẩn đoán truyền thống nhằm phát hiện, phân tích các tác nhân gây bệnh trong tương lai gần [3]. Tuy nhiên, để đảm bảo được độ nhạy cao và tính hiệu quả của cảm biến miễn dịch, ngoài việc nâng cao công nghệ chế tạo bộ chuyển đổi tín hiệu

thích hợp thì việc cố định các phần tử sinh học (kháng nguyên/kháng thể) lên trên bề mặt cảm biến vô cùng quan trọng nhằm đảm bảo được tính định hướng, hiệu suất gắn kết trên bề mặt, độ ổn định của các phần tử sinh học sau khi cố định [2, 4]. Cố định kháng thể lên bề mặt cảm biến điện hóa chủ yếu dựa trên các phương pháp như: hấp phụ trực tiếp, điện hóa, cộng hóa trị, tự tổng hợp các đơn lớp (SAM)... [1, 4]. Phương pháp điện hóa và phương pháp cộng hóa trị thường được sử dụng hơn cả nhờ những liên kết tương đối bền vững giữa các phân tử của kháng thể trên bề mặt cảm biến. Trong đó, cố định dùng phương pháp cộng hóa trị thông qua các nhóm chức được tạo ra trên bề mặt cảm biến như: amino $-NH_2$, cacboxyl $-COOH$, andehyt $-CHO$, thiol $-SH$, hydroxyl $-OH$ [5].

Ngày nay, rất nhiều các bệnh truyền nhiễm đang đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe cộng đồng. Không chế và ngăn chặn kịp thời các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm luôn là yêu cầu cấp thiết nhằm giảm thiểu nguy cơ liên quan tới sức khỏe và những thiệt hại về mặt kinh tế xã hội. Chính vì vậy, phát hiện nhanh, nhạy và sàng lọc mầm bệnh truyền nhiễm là mấu chốt để ngăn chặn quá trình lây nhiễm, có biện pháp cách ly hay điều trị kịp thời [6].

Viêm não Nhật Bản là một trong những bệnh nhiễm vi rút cấp tính ở hệ thống thần kinh trung ương. Theo thống kê, tỷ lệ mắc do vi rút VNNB ở Việt Nam trong những năm gần đây chiếm khoảng

30% trong tổng số các ca viêm não do vi rút, nguy cơ cao ở trẻ em từ 1 đến 15 tuổi. Tỷ lệ tử vong từ 0,3 đến 60% phụ thuộc vào thời gian phát hiện bệnh sớm và điều trị kịp thời [6, 7].

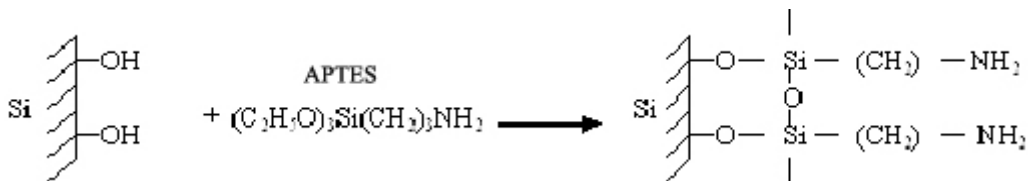
Hiện nay, có rất nhiều phương pháp và thiết bị chẩn đoán phòng thí nghiệm nhằm tìm ra tác nhân gây bệnh như: phân lập vi rút, huyết thanh học, ELISA, PCR... Tuy nhiên, các phương pháp truyền thống này thường mất hàng giờ tới hàng tuần để biết được kết quả [7, 8]. Do đó, phát triển những bộ kit chẩn đoán nhanh, chính xác tác nhân gây bệnh truyền nhiễm luôn là yêu cầu cấp thiết đối với các nhà khoa học trong nước và trên thế giới.

Nhằm phát triển bộ cảm biến miễn dịch điện hóa để phát hiện nhanh, sàng lọc vi rút VNNB từ các vụ dịch, chúng tôi sử dụng kháng thể IgM kháng vi rút VNNB tinh chế từ huyết thanh bệnh nhân trong giai đoạn đầu nhiễm vi rút để tiến hành thử nghiệm các phương pháp cố định kháng thể, tìm ra phương pháp thích hợp cho mục đích nghiên cứu. Kháng thể IgM là một trong hai loại kháng thể có số lượng nhiều nhất trong huyết thanh sau IgG, đặc biệt là trong giai đoạn đầu của quá trình nhiễm. Hơn nữa, kháng thể IgM có 10 vị trí gắn kháng nguyên, cao gấp 5 lần so với kháng thể IgG [7].

2. PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu, hóa chất

- Bộ cảm biến điện hóa với cấu hình điện cực trên dưới đã được tác giả và nhóm nghiên cứu thiết kế, chế tạo thành công tại Viện ITIMS, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội [9].



Hình 1: Quá trình silan hoá bề mặt cảm biến

Trong nghiên cứu này, 3 phương pháp cố định kháng thể IgM đã được thử nghiệm để tìm ra phương pháp thích hợp nhất cho cảm biến miễn dịch điện hóa [4, 5, 11]. Quy trình thí nghiệm đều được thực hiện ở nhiệt độ phòng.

APTES – Kháng thể (APTES-IgM)

Cảm biến sau khi silan hóa được ủ trực tiếp với 1mg/ml kháng thể IgM kháng vi rút VNNB trong 1 giờ thông qua liên kết $-NH_2$ của APTES và nhóm $-COOH$ của kháng thể, các vị trí không gắn kết đặc hiệu trên bề mặt cảm biến được khóa với 2% BSA/PBS trong 30 phút, rửa bằng PBS, pH 7,0 và để khô trong không khí.

APTES - G.A – Kháng thể (APTES - G.A - IgM)

Cảm biến sau khi silan hóa được nhúng trong

- Kháng thể IgM kháng vi rút VNNB tinh chế từ huyết thanh bệnh nhân, kháng nguyên vi rút VNNB cung cấp bởi Phòng thí nghiệm vi rút Arbo, Khoa Vi rút, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

- Protein A gắn hạt nano vàng (PrA.Au, đường kính hạt vàng cỡ 5 nm), kháng thể IgM kháng IgM người gắn FITC, 3-aminopropyl-triethoxy-silane (APTES), glutaraldehyde (G.A) được mua từ công ty Sigma, Hoa Kỳ.

- Các hóa chất khác đảm bảo các yêu cầu phân tích.

2.2. Phương pháp thực nghiệm

a) Cố định kháng thể IgM kháng vi rút VNNB cho cảm biến miễn dịch

Trước tiên, cảm biến được ngâm trong dung dịch KOH/MeOH (1:1, không pha loãng) trong 30 phút để loại bỏ chất bẩn bám dính trên bề mặt và tạo ra nhiều nhóm chức hydroxyl $-OH$. Sau đó, sử dụng nước khử ion để rửa sạch và sấy khô cảm biến bằng khí nitơ trước khi silan hóa với 5% APTES/MeOH trong 1 giờ. Quá trình silan hóa nhằm tạo ra nhóm chức amino $-NH_2$ để liên kết với kháng thể trên bề mặt cảm biến (hình 1). Một giọt axit axetic được thêm vào dung dịch trong quá trình silan hóa để định hướng nhóm amino $-NH_2$ ra phía ngoài [5]. Rửa bề mặt cảm biến 3 lần bằng nước khử ion, làm khô với khí nitơ và ủ nhiệt tại 100 - 120°C trong 6 - 8 phút để loại bỏ hoàn toàn những phân tử nước dư thừa trên bề mặt, để nguội và lưu giữ trong hộp khô ở nhiệt độ phòng cho quá trình thí nghiệm.

5% (v/v) G.A 30 phút để tạo liên kết chéo giữa APTES và kháng thể thông qua 2 nhóm chức $-CHO$ của G.A, sau đó rửa 3 lần với nước khử ion trước khi ủ với 1mg/ml kháng thể IgM kháng vi rút VNNB trong 1 giờ, các vị trí không gắn kết đặc hiệu trên bề mặt cảm biến được khóa với 2% BSA/PBS trong 30 phút, rửa bằng PBS, pH 7,0, để khô trong không khí.

APTES - G.A - Protein A gắn Au - Kháng thể (APTES - PrA.Au - IgM)

Cảm biến đã silan hóa được nhúng trong 5% (v/v) G.A trong 30 phút tạo liên kết chéo và rửa 3 lần với nước khử ion trước khi ủ với 1 mg/ml protein A.Au/PBS trong 30 phút, sau đó rửa với PBS và ủ với 1mg/ml kháng thể IgM kháng vi rút VNNB trong 1 giờ, các vị trí không gắn kết đặc hiệu trên bề

mặt cảm biến được khóa với 2% BSA/PBS trong 30 phút. Sau đó rửa trong PBS, pH 7.0 và để khô trong không khí.

Hiển vi lực nguyên tử (AFM)

Kính hiển vi lực nguyên tử (Multimode, Veeco, Hoa Kỳ) được sử dụng để quan sát sự thay đổi trên bề mặt cảm biến sau mỗi phương pháp cố định kháng thể khác nhau. Độ mập mô trên ảnh thu được phản ánh khả năng gắn kết của kháng thể trên bề mặt cảm biến. Phép đo được thực tại Viện Vật lý kỹ thuật, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Phổ hấp thụ hồng ngoại FTIR

Phép đo phổ hồng ngoại FTIR (Nicolet 6700, Thermo, Hoa Kỳ) đã được thực hiện nhằm phân tích và xác nhận sự tồn tại của kháng thể trên bề mặt cảm biến thông qua phổ hồng ngoại bị hấp thụ bởi dao động của các liên kết hoá học từ những phân tử có trên bề mặt cảm biến. Kết quả được so sánh với các nghiên cứu đã công bố trước đây.

Hiển vi huỳnh quang

Kỹ thuật huỳnh quang được áp dụng để xác nhận lượng kháng thể gắn kết trên bề mặt cảm biến thông qua thí nghiệm trên phiến silic. Các bước cố định kháng thể IgM kháng vi rút VNNB lên bề mặt phiến silic được thực hiện tương tự quy trình của các phương pháp cố định nêu trên. Sau đó ủ với kháng thể IgM kháng người gắn FITC (pha loãng theo tỷ lệ 1:50, ủ 40 phút ở nhiệt độ phòng), rửa bằng PBS rồi để khô tự nhiên và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Elipse 90i (Nikon, Nhật Bản).

Hệ khuếch đại Lock in

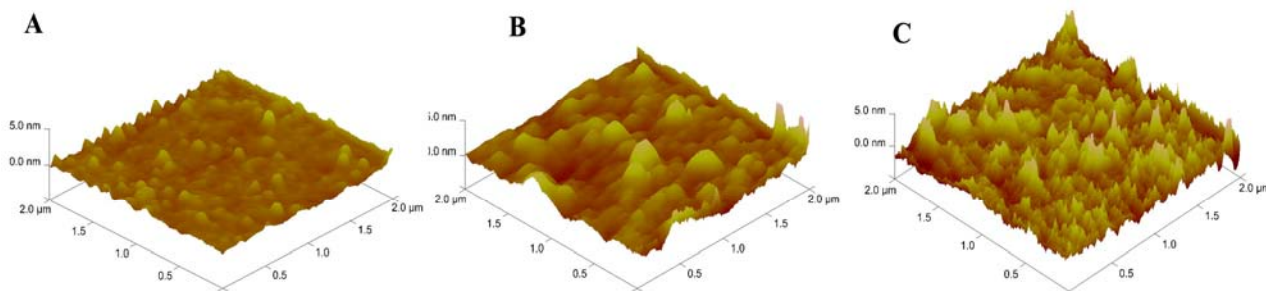
Tín hiệu dò tìm kháng nguyên vi rút VNNB được đo bằng hệ khuếch đại Lock-in (SR 830, Stanford Research System), các phép đo thực hiện ở

nhiệt độ phòng với các thông số đầu vào được thiết lập: điện thế 100 mV, tần số 10 kHz.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hình ảnh AFM về sự thay đổi hình thái bề mặt cảm biến

Trước khi cố định kháng thể, bề mặt cảm biến được rửa sạch theo quy trình để loại bỏ hoàn toàn chất bẩn bám dính trên bề mặt, được kiểm tra bằng kính hiển vi soi nổi (SMZ800, Nikon) và hiển vi điện tử quét có độ phân giải cao (S-4800, Hitachi) (dữ liệu không đưa ra). Sau đó, cảm biến được cố định với kháng thể IgM kháng vi rút VNNB bằng các phương pháp khác nhau. Như quan sát trên hình 2 A, B và C thấy rằng, độ mập mô của các hình ảnh hoàn toàn khác nhau. Trên hình 2A, bề mặt tương đối phẳng, xuất hiện các hạt có kích thước đều nhau dưới 1nm nhô lên, đó được cho là các hạt tinh thể SiO₂ thành phần, ngoài ra, một số vị trí nhô cao hơn được xem như sự có mặt của những “đám” nhỏ kháng thể IgM liên kết với bề mặt cảm biến. Khi sử dụng G.A làm chất trung gian liên kết với kháng thể và lớp APTES, bề mặt xuất hiện những chỗ lồi lõm hơn, đặc biệt là nhiều vị trí hạt nhô cao hẳn lên so với bề mặt các hạt khác xung quanh được cho là những “đám” kháng thể tập trung lại, với số lượng nhiều hơn phương pháp không sử dụng G.A (hình 2B). Đặc biệt, khi sử dụng PrA.Au, các hạt nano vàng cỡ 5 nm làm tâm dịch chuyển điện tử giữa các phân tử sinh học và điện cực cũng như giữa các điện cực, còn PrA chỉ đóng vai trò là chất ổn định bề mặt cho các hạt vàng. Trên hình 2C cho thấy xuất hiện rất nhiều các đỉnh nhỏ chiều cao hơn 5 nm đó được cho là do tác động của hạt vàng và các phân tử PrA. Hơn nữa, có thể một lượng kháng thể IgM nhất định gắn ái lực với các hạt vàng hoặc liên kết trực tiếp với G.A. Do đó, các hình ảnh AFM có thể thấy rõ nét sự biến đổi bề mặt khi cố định kháng thể với các phương pháp khác nhau.

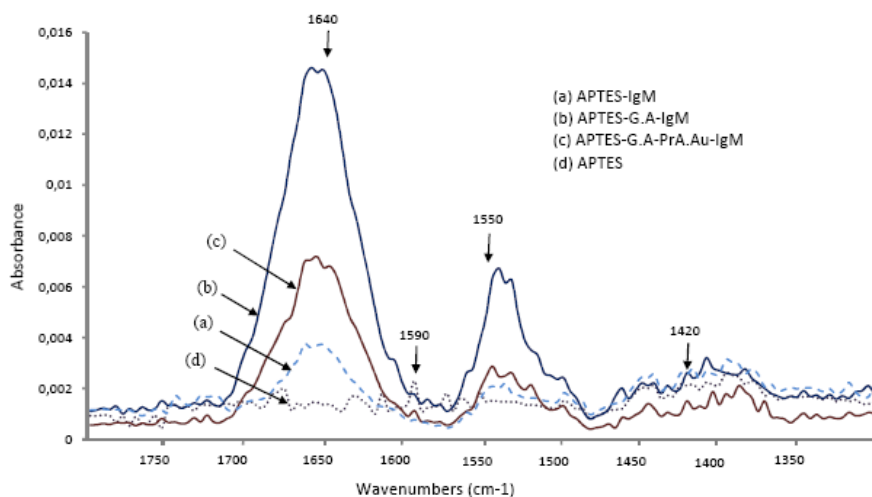


Hình 2: Hình ảnh AFM của bề mặt cảm biến sử dụng các phương pháp cố định kháng thể khác nhau. A) Bề mặt cảm biến được cố định kháng thể trực tiếp trên lớp APTES. B) Bề mặt cảm biến sau khi cố định kháng thể thông qua liên kết chéo G.A với lớp APTES. C- Bề mặt cảm biến sử dụng Protein A.Au và gắn kháng thể sau khi ngâm trong 5% G.A.

3.2. Phổ hấp thụ hồng ngoại FTIR

Độ nhạy của cảm biến miễn dịch điện hóa phụ thuộc rất lớn vào hiệu suất gắn kết và sự định hướng kháng thể trên bề mặt cảm biến. Để xác định số lượng kháng thể IgM tồn tại trên bề mặt cảm biến khi sử dụng các phương pháp cố định khác nhau, chúng tôi đã sử dụng thiết bị đo phổ hồng ngoại để xác định các mode dao động đặc trưng cho các phần tử trên bề mặt cảm biến. Hình 3 cho thấy, các đỉnh phổ hấp thụ thu được trong vùng số sóng 1800 – 1300 cm^{-1} đặc trưng cho các vùng và mode dao động của protein (kháng thể). Với 3 phương pháp khác nhau đều xuất hiện các đỉnh phổ hấp thụ đặc trưng cho protein, đó là vùng amit I trong khoảng số sóng 1640 cm^{-1} , với các dao động chủ yếu của liên kết

C=O, vùng amide II trong khoảng số sóng 1550 cm^{-1} với các dao động của liên kết C-N và N-H. Đỉnh phổ tại 1420 cm^{-1} cũng được cho là dao động của C=O. Tuy nhiên, cường độ hấp thụ mạnh nhất là của phương pháp chỉ sử dụng G.A làm phần tử trung gian, đồng nghĩa với sự có mặt kháng thể nhiều nhất trên bề mặt cảm biến được ghi nhận. Ngoài ra, các đỉnh phổ trên không xuất hiện đối với bề mặt cảm biến được silan hóa nhưng chưa cố định kháng thể. Ngược lại, đỉnh phổ tại 1590 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm $-\text{NH}_2$ có thể tìm thấy trên bề mặt này mà hầu như không ghi nhận được hoặc đỉnh hấp thụ rất yếu trên các bề mặt khác khi đã cố định kháng thể. Những kết quả thu được phù hợp với một số nghiên cứu về phổ hấp thụ hồng ngoại của protein được công bố trước đây [10, 12].



Hình 3: Phổ FTIR xác nhận sự tồn tại của kháng thể IgM trên bề mặt cảm biến sử dụng các phương pháp cố định khác nhau

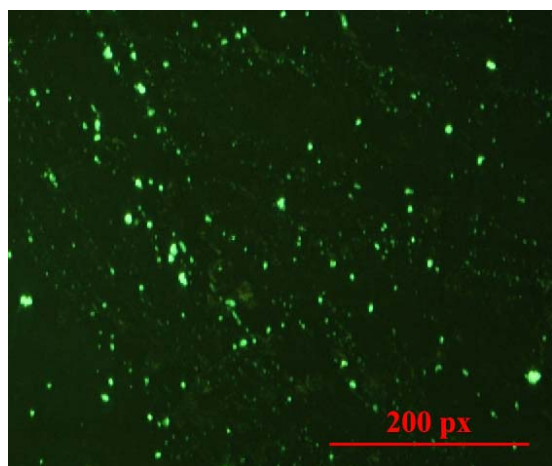
3.3. Hiện vi huỳnh quang

Bằng phương pháp quan sát sự phát quang của FITC của kháng thể kháng người dưới kính hiển vi huỳnh quang, xác nhận gắn kết kháng thể IgM trên phiến silic, chúng tôi nhận thấy rằng, với phương pháp cố định APTES – G.A – IgM, các đốm huỳnh quang màu lá mạ xuất hiện dày đặc và đồng đều hơn so với sử dụng các phương pháp cố định khác, đốm phát quang xuất hiện trên khắp bề mặt phiến silic - khu vực thực hiện phản ứng (hình 4). Điều đó ghi nhận sự gắn kết tốt của kháng thể trên phiến silic, củng cố thêm bằng chứng chứng tỏ sự gắn kết có hiệu quả của kháng thể IgM kháng vi rút VNNB tương tự như trên bề mặt cảm biến miễn dịch.

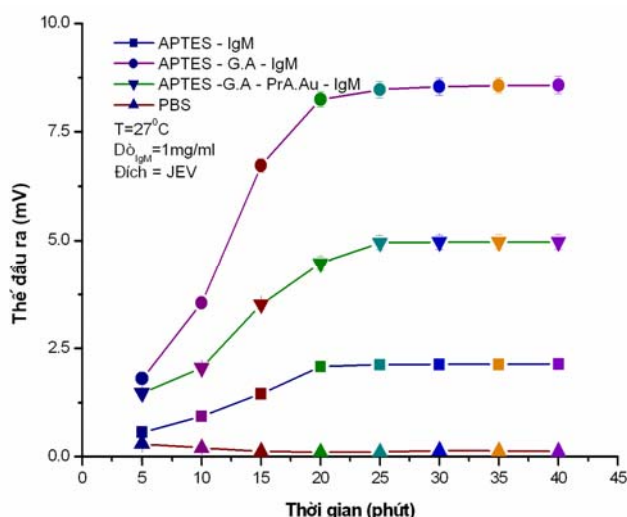
3.4. Kết quả dò tìm kháng nguyên vi rút VNNB

Độ nhạy của cảm biến miễn dịch sử dụng các

phương pháp cố định khác nhau được xác định thông qua phép đo đặc để phát hiện kháng nguyên vi rút VNNB trong mẫu phân tích, trên hệ khuếch đại Lock in RS830. Kết quả lặp lại thí nghiệm cho thấy rằng, tín hiệu dò tìm kháng nguyên vi rút VNNB của cảm biến miễn dịch điện hóa xuất hiện ngay sau 5 phút và ổn định sau khoảng 20 phút tính từ khi nhúng cảm biến vào dung dịch chứa kháng nguyên. Khả năng phát hiện nồng độ mẫu nhỏ hơn 60 lần so với pha loãng kháng nguyên chuẩn của kỹ thuật MAC-ELISA sản xuất tại Việt Nam. Đặc biệt, tín hiệu dò tìm kháng nguyên ở những cảm biến sử dụng phương pháp cố định APTES – G.A – IgM cao hơn 2 đến 3 lần so với tín hiệu từ các cảm biến khác (hình 5). Ngoài ra, những thí nghiệm đối chứng, đo đặc trong nước khử ion và dung dịch PBS x1 không chứa mẫu, kết quả cho thấy tín hiệu đầu ra của các loại cảm biến này hầu như không thay đổi hoặc thay đổi không đáng kể.



Hình 4: Kháng thể IgM gắn kết hiệu quả trên bề mặt phiến silic thông qua sự phát quang của kháng thể kháng người gắn FITC, sử dụng phương pháp APTES – G.A - IgM



Hình 5: Tín hiệu dò tìm kháng nguyên vi rút VNNB của cảm biến miễn dịch sử dụng các phương pháp cố định kháng thể IgM khác nhau

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện ba phương pháp khác nhau để cố định kháng thể IgM kháng vi rút VNNB cho cảm biến miễn dịch điện

Liên hệ: **Trần Quang Huy**

Viện Đào tạo quốc tế về Khoa học vật liệu
 Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
 Số 1, Đại Cồ Việt, Hà Nội
 Email: huytq@nihe.org.vn

hóa. Kết quả phân tích cho thấy rằng phương pháp APTES – G.A – IgM cho kết quả tốt nhất, tín hiệu dò tìm kháng nguyên của cảm biến sử dụng phương pháp này cao hơn 2 đến 3 lần so với sử dụng các phương pháp cố định khác. Ngoài ra, tín hiệu đáp ứng cũng xuất hiện ngay sau 5 phút và ổn định sau 20 phút kể từ khi cho cảm biến tiếp xúc với dung dịch mẫu pha loãng 60 lần so với dung dịch pha loãng chuẩn sử dụng cho phương pháp MAC-ELISA sản xuất tại Việt Nam. Những kết quả này là cơ sở để ứng dụng phát triển các bộ cảm biến miễn dịch điện hóa nhằm phát hiện nhanh vi rút viêm não Nhật Bản trong các vụ dịch ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia, đề tài mã số 106.16.181.09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Claire. Morgan, DJ Newman and CP Price. Clinical Chemistiy, 193 - 209 (1996).
- Luppa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. Clinica. Chimica Acta, 314, 1 - 26 (2001).
- Olivier L, F. Javier Del Campo et al. Biosensors and Bioelectronics, 22, 1205 - 1217 (2007) .
- Paul Peluso, David S. Wilson et al. Analytical Biochemistry, 312, 113 - 124 (2003).
- Avraham Rasooly and Keith E.Herold. Methods in Molecular Biology: Biosensor and Biodetection, chapter 23, vol 504. Humana Press, Springer 2009.
- <http://www.who.int>
- Phan Thị Ngà. Vi rút viêm não Nhật Bản và các kỹ thuật chẩn đoán. Nxb Y học (2004).
- Brian WJ Mahy and Hillar O Kangro. Virology Methods Manual. Academic Press (1995).
- Huy, T. Q., Tam P. D, Tuan M. A., and Chien N.D. Pr. of the 2nd Int. Con. on Biomedical Engineering, 273 -j 278 (2007).
- Kong, J. and Yu, S. Acta Bio. Rt Biophys. Sini., 39 (8) 549 - 559 (2007).
- Takeshi Ikeda et al. Analytical Biochemistry 358, 132 - 137 (2009).
- Sudam K. Paria et al. Advance in Colloid and Interface Science 121, 77 - 110 (2006).