

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

PHẠM THỊ KIM THẢO

**NGHIÊN CỨU CỐ ĐỊNH KHÁNG THỂ LÊN
HẠT NANO SẮT TỬ NHẪM ỨNG DỤNG
TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TIỀN LIỆT
TUYẾN**

**Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học
Mã số: 60 42 02 01**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng – Năm 2016

Công trình được hoàn thành tại

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. LÊ LÝ THÙY TRÂM

Phản biện 1: TS. Đặng Đức Long

Phản biện 2: TS.BS. Nguyễn Thị Thanh Hương

Luận văn sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ Công nghệ Sinh học họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 30 tháng 08 năm 2016

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

– Trung tâm Thông tin-Học liệu, Đại học Đà Nẵng

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Các vật liệu có kích thước nano hiện nay đang được đặc biệt quan tâm nghiên cứu chế tạo và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Khi kích thước giảm xuống đến nanomet, các hạt oxit sắt từ trở thành vật liệu siêu thuận từ với từ độ bão hòa cao và lực kháng từ gần bằng không. Các protein và các đại phân tử trong tế bào có kích thước ở thang nano nên các vật liệu có kích thước nano (như hạt nano sắt từ) trở thành các chất đánh dấu lý tưởng để đưa vào các hệ sinh học. Hơn thế nữa, các vật liệu này cũng dễ dàng được biến đổi bề mặt với các nhóm chức hóa học khác nhau, cho phép tích hợp các hạt nano từ với các phân tử sinh học dễ dàng hơn. Những điều này đã mở ra ứng dụng rộng rãi của hạt nano từ trong sinh học phân tử và y sinh như vận chuyển thuốc và gen, phát hiện protein [2], [3].

Ung thư tiền liệt tuyến là ung thư xảy ra ở tuyến tiền liệt của đàn ông, một tuyến có hình quả óc chó nhỏ tạo ra tinh dịch nuôi dưỡng và vận chuyển tinh trùng. Đây là một trong những loại bệnh ung thư gây chết phổ biến thứ 2 ở nam giới, tương tự như ung thư vú ở phụ nữ. Bệnh này thường phát triển chậm và ban đầu vẫn còn giới hạn trong tuyến tiền liệt, nơi nó có thể không gây ra thiệt hại nghiêm trọng. Do đó, nếu được phát hiện sớm khi khối u vẫn còn giới hạn trong tuyến tiền liệt thì cơ hội điều trị bệnh thành công là rất cao.

Trong những thời gian gần đây, ở nước ta đã có nhiều kỹ thuật nhằm chẩn đoán UTTLT. Có thể kể đến như: siêu âm tuyến tiền liệt qua trực tràng, soi bàng quang, sinh thiết qua trực tràng. Tuy nhiên những kỹ thuật này có nhược điểm là chỉ đến khi bệnh có biểu hiện

ra bên ngoài mới được tiến hành dẫn đến có nguy cơ không chữa trị kịp thời và chi phí xét nghiệm khá cao.

Trong chẩn đoán sớm bệnh ung thư tiền liệt tuyến thì vai trò của kháng nguyên PSA (Prostate-specific antigen) là rất quan trọng. Từ năm 1986, PSA đã được tổ chức kiểm soát thực phẩm và thuốc của Hoa Kỳ (FDA) công nhận là chỉ thị sinh học để theo dõi điều trị cho bệnh nhân ung thư tiền liệt tuyến và từ năm 1994, nó được công nhận là chỉ thị sinh học để phát hiện sớm ung thư tiền liệt tuyến cho nam giới trên 50 tuổi tại Mỹ.

Hiện nay tại các bệnh viện chủ yếu sử dụng phương pháp ELISA để xác định nhanh lượng kháng nguyên PSA trong máu dựa trên phản ứng kháng nguyên- kháng thể. Tuy nhiên phương pháp này vẫn có một số hạn chế về độ nhạy, thao tác phức tạp, tốn hiệu nên cao... Xuất phát từ thực tế này, chúng tôi mong muốn tìm kiếm một phương pháp chẩn đoán mới với độ nhạy cao hơn để khắc phục những nhược điểm của phương pháp truyền thống ELISA. Với mục tiêu này, chúng tôi đã nhắm tới việc sử dụng hạt nano sắt từ bởi những tính chất ưu việt của vật liệu này cũng như những ứng dụng của nó trong lĩnh vực y sinh. Do vậy chúng tôi thực hiện đề tài ***“Nghiên cứu cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ nhằm ứng dụng trong chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến”***. Đây là đề tài nhánh trong đề tài KC.03.29/11-15 “Nghiên cứu thiết kế và chế tạo máy xét nghiệm các tham số PSA, CA15-3 và HER2 sử dụng hạt nano sắt từ”, liên kết giữa bộ môn Công nghệ sinh học và Điện tử Viễn thông – ĐH Bách khoa.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Xây dựng quy trình cô định kháng thể kháng PSA lên hạt nano sắt từ tạo ra phức hợp MNPs-KT2, sử dụng trong bộ kit chẩn đoán UTTLT bằng thiết bị cảm biến từ
- Đánh giá độ đặc hiệu của kháng thể cô định đối với kháng nguyên PSA.
- Đánh giá khả năng ứng dụng của phức hợp MNPs-KT2 trong việc phát hiện kháng nguyên PSA từ các mẫu bệnh phẩm (huyết thanh) bằng thiết bị cảm biến..

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Kháng thể kháng kháng nguyên PSA

Hạt nano sắt từ Fe₃O₄/SiO₂/NH₂ (kí hiệu MNPs)

Mẫu bệnh huyết thanh xác định dương tính với PSA thu nhận từ bệnh viện Ung Bướu, Bệnh viện C Đà Nẵng.

Quy mô phòng thí nghiệm, sử dụng kháng nguyên PSA nhân tạo

4. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp hóa học: phản ứng tạo nhóm CHO tự do sử dụng Glutaraldehyde, phản ứng tạo nhóm –COOH tự do trên bề mặt hạt từ sử dụng succinic anhydride, phản ứng hoạt hóa nhóm –COOH với EDC/sulfo-NHS.
- Phương pháp Bradford
- Phương pháp đo OD₂₈₀ sử dụng thiết bị nanodrop
- Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi chuỗi (FTIR)
- Phương pháp chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)
- Phương pháp miễn dịch enzyme (ELISA)
- Phương pháp đo tín hiệu từ bằng thiết bị cảm biến từ

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

- Ý nghĩa khoa học

Đóng góp vào kho tài liệu thông tin khoa học phương pháp, và quy trình cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ, quy trình ứng dụng kháng thể cố định trong chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến sử dụng thiết bị cảm biến từ.

- Ý nghĩa thực tiễn

Chuẩn hóa quy trình gắn kết kháng thể lên hạt nano từ tính. Thúc đẩy nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong chẩn đoán bệnh ở Việt Nam.

6. Bố cục luận văn

Luận văn được kết cấu gồm:

Phần mở đầu: 4 trang

Chương 1: Tổng quan tài liệu: 29 trang

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 32 trang

Chương 3: Kết quả vào thảo luận: 33 trang

Kết luận và kiến nghị: 2 trang

Danh mục tài liệu tham khảo: 3 trang

Phụ lục 3 trang

CHƯƠNG 1

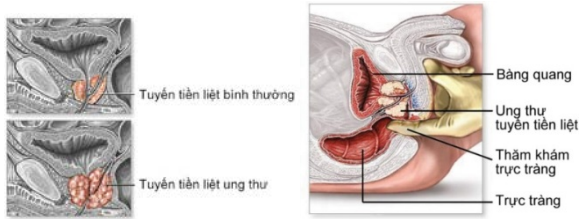
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. BỆNH UNG THƯ TIỀN LIỆT TUYẾN

1.1.1. Ung thư tiền liệt tuyến (UTTTLT)

Ung thư tiền liệt tuyến là bệnh lý ác tính xuất phát từ các tế bào tuyến bên trong tuyến tiền liệt. Là một trong những loại phổ biến nhất của bệnh ung thư ở nam giới. Ung thư tiền liệt tuyến thường phát triển chậm và ban đầu vẫn còn giới hạn trong tuyến tiền liệt.

Ảnh cắt lát phần tuyến tiền liệt để nhận biết bệnh UTTLT mô tả ở hình 1.1.



Hình 1.1. Hình giải phẫu ung thư tuyến tiền liệt [11]

Xét nghiệm nồng độ PSA trong máu là xét nghiệm máu duy nhất giúp phát hiện sớm ung thư. Kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt PSA (Prostate Specific Antigen) là một glycoprotein được tiết ra bởi các tế bào biểu mô của tuyến tiền liệt. Phần lớn PSA trong máu được gắn với các protein huyết tương, một lượng nhỏ (khoảng 30%) của PSA không gắn với protein được gọi là PSA tự do (free PSA), dạng này không có hoạt tính phân hủy protein. Tỷ lệ PSA tự do/ PSA toàn phần (free PSA/ total PSA ratio = fPSA/ tPSA) được đánh giá để chẩn đoán UTTLT khi nồng độ tPSA nằm trong khoảng từ 4 đến 10 ng/mL. Nguy cơ UTTLT cao nếu tỷ lệ f PSA/ tPSA $\leq 0,15$ (15%). [14], [20].

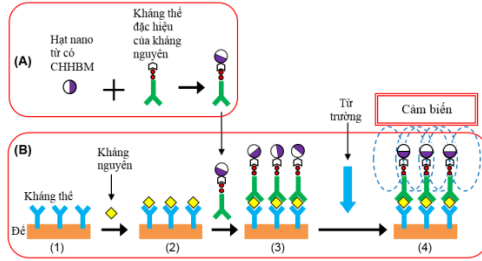
Bảng 1.2. Sự liên quan giữa mức độ PSA toàn phần và tỷ lệ UTTLT [32]

PSA toàn phần (ng/mL)	Tỷ lệ UTTLT (%)
0 – 2,4	Hiếm gặp
2,5 – 4,0	12 - 23
4,1 – 10,0	25
> 10,0	> 50

Kích thước đặc trưng trung bình của các tế bào hữu cơ sống vào khoảng 10 μm . Tuy nhiên, các thành phần của tế bào thường có kích thước dưới 1 μm và kích thước của các protein vào khoảng 5 nm. Tương tự, kích thước của các phân tử nhỏ vào cỡ 1 đến 10 nm, của các virut sống vào khoảng 10 đến 100 nm. Các kích cỡ này tương đương với kích thước của các hạt nano từ (1-100 nm) do con người tạo ra. Sự so sánh giản đơn này làm nảy sinh ý tưởng sử dụng các hạt nano từ tích hợp vào các hệ sinh học để giúp giải quyết các bài toán y sinh [3].

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp gắn trực tiếp kháng thể hoàn chỉnh lên bề mặt hạt sử dụng nhóm chức tự do là $-\text{NH}_2$ trên kháng thể gắn kết với hạt từ đã được tạo nhóm chức $-\text{CHO}$ và $-\text{COOH}$. Kháng thể cố định được ứng dụng phát hiện kháng nguyên PSA chuẩn đoán UTTLT sử dụng thiết bị cảm biến từ theo nguyên lý như sau:

Các kháng nguyên đặc trưng của bệnh được bắt giữ bởi kháng thể cố định trên hạt nano từ và được đo đặc hàm lượng thông qua phép đo từ trường cảm ứng sử dụng cảm biến từ. Do liên kết đặc hiệu giữa KN PSA đặc trưng của bệnh và KT tương ứng với nó nên việc tạo ra liên kết giữa KN và KT đặc hiệu có gắn hạt nano từ là chắc chắn xảy ra. Lược đồ quá trình chuẩn bị, gắn kết và đo đạc được trình bày trên Hình 1.10



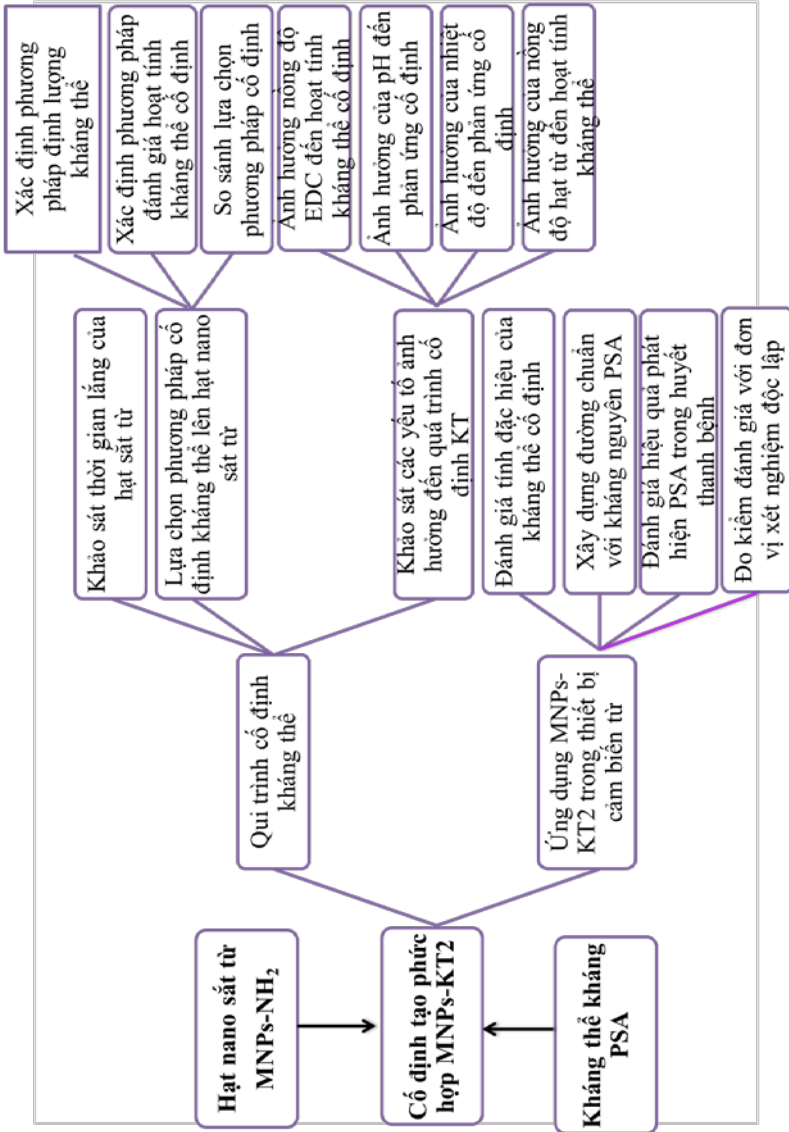
Hình 1.8. Mô hình nguyên lý cảm biến từ phát hiện kháng nguyên

Quy trình (A): Chuẩn bị phức hợp kháng thể 2 đặc hiệu kháng nguyên cố định lên hạt từ nhờ lớp chất hoạt hóa bề mặt tạo MNPs-KT2. Quy trình (B) phát hiện kháng nguyên (KN) trong mẫu bằng thiết bị cảm biến từ: B(1) Kháng thể 1 (KT1) đặc hiệu kháng nguyên cố định trên đế (giếng ELISA), B(2) Phủ mẫu chứa PSA, kháng nguyên sẽ bị bắt giữ trên giếng, B(3) Thêm kháng thể 2 đặc hiệu kháng nguyên PSA đã được cố định trên hạt nano sắt từ, phức hợp MNPs-KT2 dư sẽ được loại bỏ qua các lần rửa, B(4) Đưa phức hệ KT1-KN-KT2-MNPs vào thiết bị đo từ, và mỗi hạt từ sẽ phát tín hiệu điện từ, tín hiệu này được thiết bị cảm biến ghi nhận, do lượng kháng nguyên tỉ lệ thuận lượng hạt từ, điều này cho phép xác định được nồng độ kháng nguyên trong mẫu.

Như vậy với mục tiêu đề tài đặt ra là:

- Xây dựng quy trình cố định kháng thể kháng PSA lên hạt nano sắt từ tạo ra phức hợp MNPs-KT2
- Đánh giá độ đặc hiệu của kháng thể cố định trong việc phát hiện kháng nguyên PSA từ mẫu bệnh phẩm, và ngưỡng phát hiện của phương pháp xác định nồng độ kháng nguyên PSA sử dụng kháng thể cố định trên hạt nano sắt từ bằng thiết bị cảm biến từ.

Nội dung nghiên cứu sẽ được thể hiện tóm tắt trong sơ đồ sau:



Hình 1.13. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

CHƯƠNG 2

VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP

2.1. VẬT LIỆU

2.1.1. Hạt nano sắt từ đã được bọc SiO₂ và gắn nhóm NH₂

Chúng tôi đặt hàng hạt nano sắt từ tại Trường Khoa học Tự nhiên Đại học Quốc gia Hà Nội (phụ lục 1). Hạt từ sử dụng cho nghiên cứu được bọc bởi SiO₂ và có chứa nhóm NH₂ tự do trên bề mặt như hình 2.1 [3].

2.1.2. Kháng thể IgG

- Kháng thể đơn dòng IgG kháng PSA đã được biotin hóa từ bộ kit ELISA, Sigma-Mỹ, phụ lục 1
- Kháng thể IgG đơn dòng kháng PSA (1mg/ml) Sigma-Mỹ

2.1.3. Mẫu huyết thanh

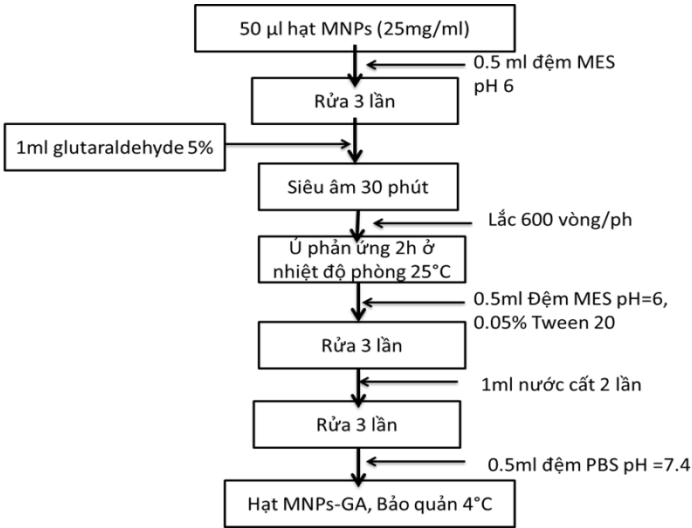
- Mẫu huyết thanh người khỏe mạnh âm tính với PSA, Her2, CA15-3.
- Mẫu huyết thanh bệnh phẩm đã xác định kháng nguyên PSA bằng phương pháp ELISA, thu nhận từ Bệnh viện Ung bướu và Bệnh viện C Đà Nẵng

2.2. HÓA CHẤT

2.3. PHƯƠNG PHÁP

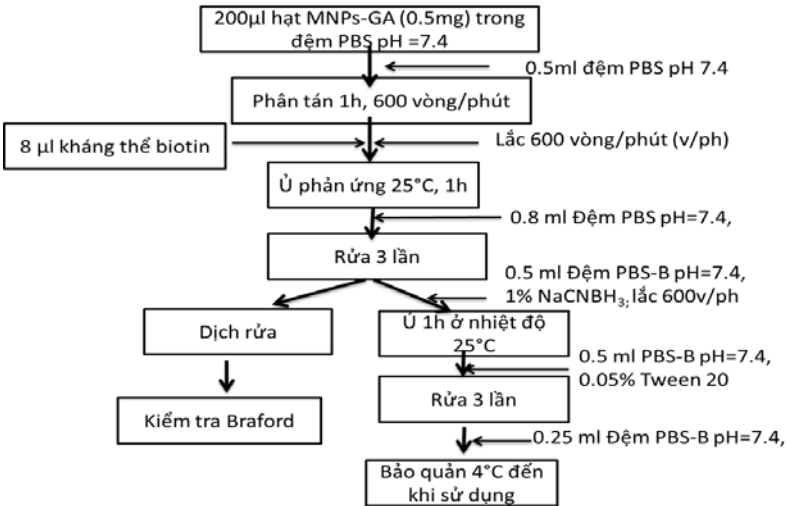
2.3.1. Phương pháp hoạt hóa bề mặt sử dụng Glutaraldehyde tạo nhóm –CHO (Phương pháp GA)

a. Quy trình hoạt hóa bề mặt hạt sắt từ sử dụng Glutaraldehyde



Hình 2.3. Quy trình hoạt hóa bề mặt hạt sắt từ sử dụng GA 5%[9]

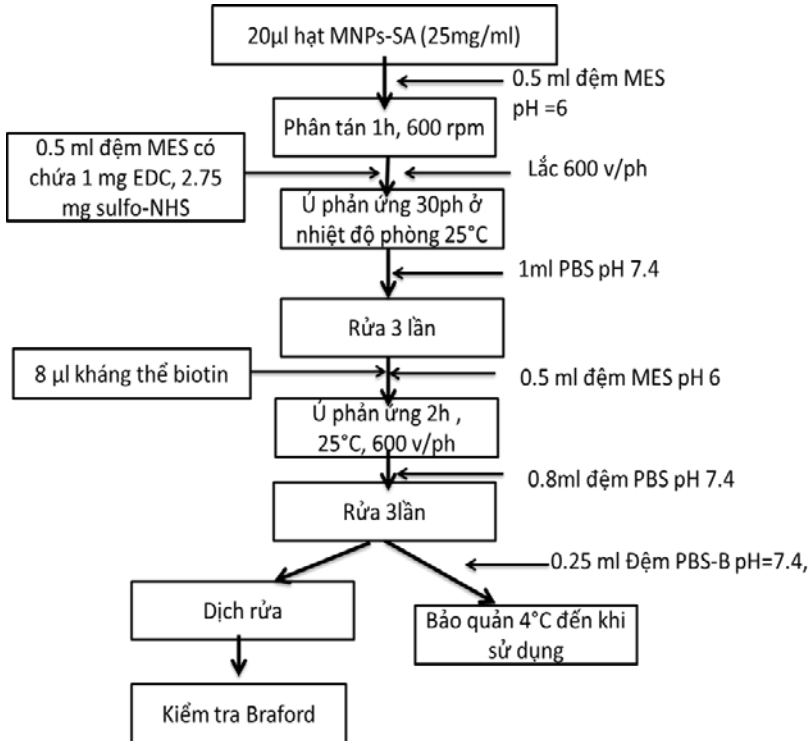
b. Quy trình cố định kháng thể thông qua liên kết cộng hóa trị giữa $-CHO$ và $-NH_2$.



Hình 2.4. Quy trình cố định kháng thể bằng liên kết cộng hóa trị giữa nhóm $-CHO$ và NH_2 [9]

2.3.2. Phương pháp tạo nhóm COOH trên bề mặt hạt MNPs sử dụng Succinic anhydric (SA)

2.3.3. Phương pháp hoạt hóa nhóm –COOH sử dụng EDC/sulfo-NHS.



Hình 2.8. Quy trình sử dụng EDC và sulfo-NHS để kích hoạt nhóm-COOH trên bề mặt hạt từ phản ứng với kháng thể

2.3.4. Phương pháp Bradford [6], [40]

2.3.5. Phương pháp đo độ hấp thụ của protein ở bước sóng 280 nm sử dụng thiết bị nanodrop [6], [42].

2.3.6. Phương pháp đo phổ hồng ngoại biến đổi chuỗi FT-IR [3], [4].

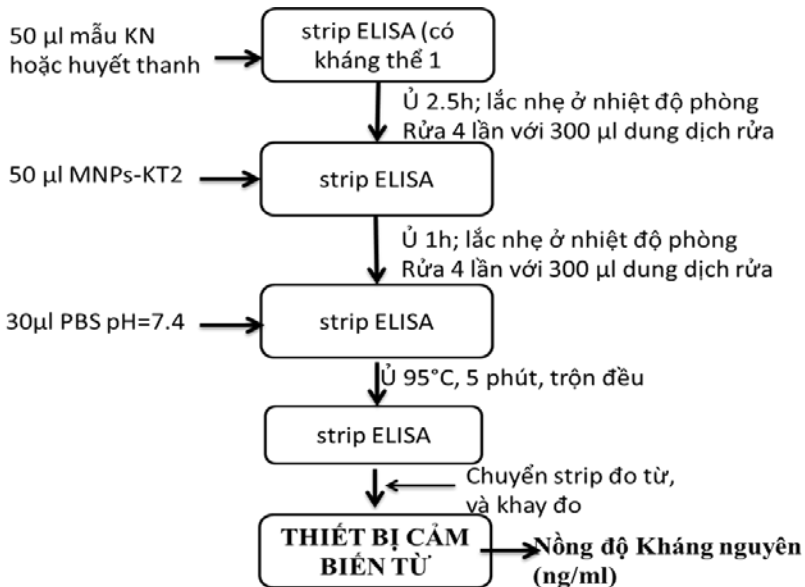
2.3.7. Phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) [3]

Mẫu gửi phân tích tại phòng hiển vi điện tử- Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương- Hà nội.

2.3.8. Phương pháp ELISA [5],[6]

Sự thay đổi giá trị ΔOD_{450} theo nồng độ kháng nguyên cho phép kết luận kháng thể sau cố định trên hạt từ vẫn còn hoạt tính

2.3.9. Phương pháp xác định nồng độ kháng nguyên, dùng thiết bị cảm biến



Hình 2.11. Quy trình xét nghiệm nồng độ kháng nguyên bằng thiết bị cảm biến [47]

2.4. BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

2.4.1. Khảo sát thời gian lắng của hạt từ trong dịch rửa hạt (đệm PBS pH 7.4).

2.4.2. Khảo sát phương pháp cố định kháng thể lên bề mặt hạt từ.

2.4.3. Phân tích sự thay đổi của hạt nano sắt từ sau các bước thao tác cố định kháng thể theo phương pháp được chọn

2.4.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình cố định kháng thể được lựa chọn

2.4.5. Ứng dụng kháng thể cố định trên hạt nano sắt (MNPs-KT2) từ xác định nồng độ kháng nguyên sử dụng thiết bị cảm biến từ.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. KHẢO SÁT THỜI GIAN LẮNG CỦA HẠT NANO SẮT TỪ

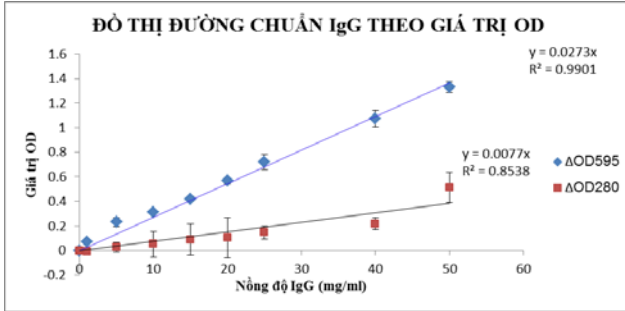
3.1.1. Khảo sát thời gian lắng của hạt từ trong dịch rửa hạt (đệm PBS pH 7.4)

Chúng tôi chọn khoảng thời gian 5 phút cho tất cả quá trình thao tác rửa hạt trong nghiên cứu.

3.2. KHẢO SÁT PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH KHÁNG THỂ

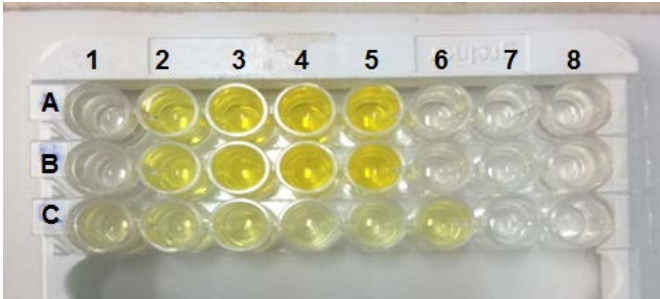
3.2.1. Xây dựng phương pháp xác định % kháng thể cố định trên hạt sắt từ

Với độ tin cậy $R^2 = 0.9901$, chúng tôi chọn phương pháp Bradford để xác định % kháng thể cố định và sử dụng phương trình đường chuẩn hình 3.3 cho nghiên cứu tiếp.



Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ IgG và giá trị mật độ quang OD theo phương pháp Bradford và phương pháp đo độ hấp thụ protein ở bước sóng 280 sử dụng thiết bị nanodrop.

3.2.2. Xây dựng phương pháp xác định hoạt tính kháng thể cố định

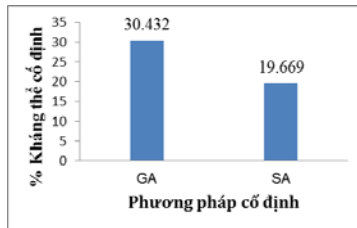


Hình 3.5. Sự thay đổi màu theo nồng độ kháng nguyên khi sử dụng kháng thể tự do và kháng thể cố định.

Dãy A, B: cường độ màu đường chuẩn ELISA sử dụng kháng thể tự do;
 Dãy C: cường độ màu thay đổi khi sử dụng kháng thể cố định (giếng C1-C3, C4-C6 nồng độ kháng nguyên tăng dần 4ng/ml, 8ng/ml, 12ng/ml)

Xây dựng đường chuẩn tuyến tính với R^2 0.9924. Như vậy để chọn phương pháp cố định kháng thể chúng tôi căn cứ vào kết quả % kháng thể cố định (bằng phương pháp Bradford) và hoạt tính kháng thể sau cố định (bằng phương pháp ELISA)

3.2.3. Lựa chọn phương pháp cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ



Hình 3.8. Đồ thị % kháng thể đã cố định trên hạt từ

GA: phương pháp sử dụng glutaraldehyde; SA: phương pháp sử dụng succinic anhydride

Quan sát hình 3.7, Phương pháp GA cho kết quả gắn kết kháng thể nhiều hơn phương pháp SA.

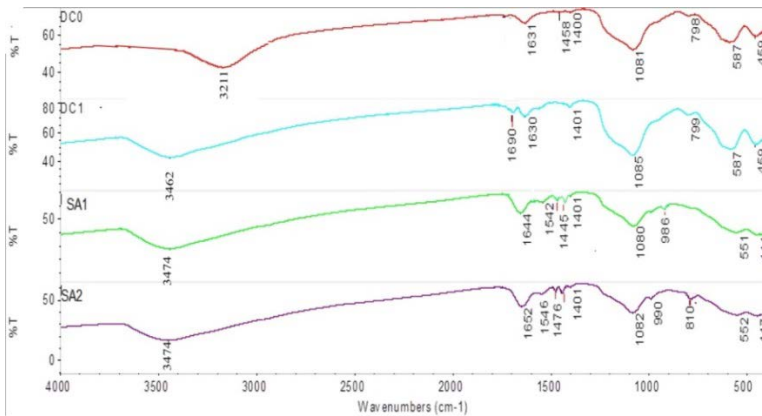
Bảng 3.5. Giá trị OD_{450} mẫu kháng thể cố định theo nồng độ kháng nguyên

Nồng độ KN (ng/ml)	1	2.5	4	5	8	12
ΔOD_{450} KT tự do	0.506 ± 0.03	1.061 ± 0.008	1.592 ± 0.04	2.013 ± 0.101	3.081 ± 0.09	
Giá trị ΔOD_{450} SA			0.217 ± 0.055		0.705 ± 0.069	0.744 ± 0.074
Giá trị ΔOD_{450} GA			0.112 ± 0.042		0.131 ± 0.031	0.212 ± 0.053

Tóm lại, hoạt tính kháng thể cố định theo phương pháp sử dụng succinic anhydride (SA) cao hơn hoạt tính kháng thể cố định theo phương pháp sử dụng glutaraldehyde (GA), do đó chúng tôi sẽ sử dụng kháng thể cố định theo phương pháp SA (MNPs-KT2(SA)) để tiếp tục cho các ứng dụng chẩn đoán UTTLT bằng thiết bị cảm biến từ.

3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH SỰ THAY ĐỔI BỀ MẶT VÀ KÍCH THUỐC HẠT MNPS-KT2(SA)

3.3.1. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại biến đổi chuỗi (FTIR)



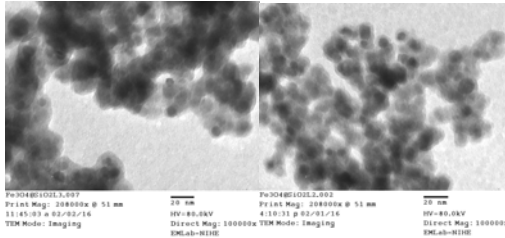
Hình 3.9. Kết quả phân tích FTIR của 4 mẫu gồm:

ĐC: mẫu DC0: MNPs; DC1: mẫu MNP-SA, mẫu SA1: MNPs-KT2(SA) lần 1, SA2 MNPs- KT2(SA) lần 2.

Đỉnh dao động tại vị trí 1690 cm^{-1} đã trở nên yếu hơn nhiều kể từ khi các bề mặt hạt từ MNPs -SA được phản ứng với kháng thể. Điều này phù hợp với các báo cáo của nhóm tác giả Lou Z [29], [30], [44]. Các đỉnh dao động tại vị trí 1542 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} , và 1476 cm^{-1} là đại diện các nhóm cacboxyl của proteins [34] Và đỉnh tại 1542

cm^{-1} là do các nhóm $-\text{CH}_2$ của protein [13]. Dải amide II được tạo thành từ sự biến dạng trong mặt phẳng liên kết NH và dao động co giãn CN nằm trong vùng số sóng $1575\text{-}1480\text{cm}^{-1}$ [24]. Tất cả các kết quả cho thấy chúng tôi đã cố định được KT lên bề mặt hạt sắt từ.

3.3.2. Kết quả ảnh chụp TEM mẫu hạt MNPs-KT2(SA)

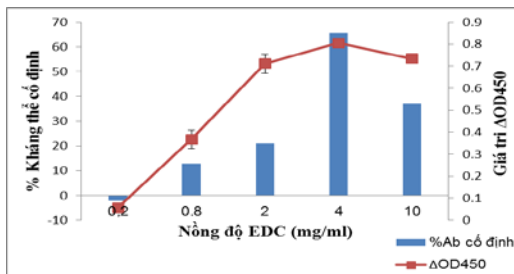


Hình 3.10. Kích thước hạt từ sau cố định kháng thể

Kết quả chụp TEM cho thấy kích thước hạt trước khi cố định 12-15nm [3], hạt sau cố định kháng thể, gắn kết với kháng nguyên có kích thước tăng lên 20nm.

3.4. KHẢO SÁT YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHẢN ỨNG CỐ ĐỊNH

3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ EDC và nồng độ sulfo-NHS đến phản ứng cố định kháng thể lên bề mặt hạt từ.



Hình 3.11: Đồ thị ảnh hưởng của EDC đến % kháng thể cố định

Từ hình 3.11 chúng tôi chọn nồng độ cuối EDC cho phản ứng hoạt hóa là 4mg/ml, sulfo-NHS 12.1mg/ml khi sử dụng 1mg/ml hạt nano sắt từ.

3.4.2. Ảnh hưởng của pH đến quá trình cố định

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng thể thông qua giá trị ΔOD_{450}

pH	5.5	6	7.4
Giá trị ΔOD_{450}	0.913 ± 0.054	0.805 ± 0.024	0.606 ± 0.033

Chúng tôi chọn pH 5.5 cho nghiên cứu tiếp theo.

3.4.3. Ảnh hưởng nhiệt độ quá trình cố định

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính kháng thể cố thông qua giá trị ΔOD_{450}

Nhiệt độ	4°, qua đêm	25°C, 2h	37°C, 2h
Giá trị ΔOD_{450}	0.687 \pm 0.065	0.913 \pm 0.054	0.835 \pm 0.041

Chúng tôi chọn 25°C 2h, cho phản ứng cố định kháng thể trong nghiên cứu tiếp theo

3.4.4. Ảnh hưởng nồng độ hạt từ đến hoạt tính cố định kháng thể

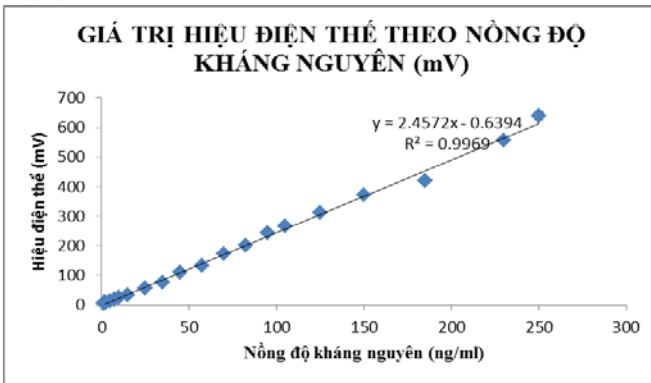
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ hạt từ đến hoạt tính kháng thể cố định thông qua giá trị ΔOD_{450}

Nồng độ hạt từ (mg/ml)	Kháng thể cố định MNPs-KT2(SA)					
	0.2	1	1.4	1.6	2	2.5
ΔOD_{450}	0.211 ± 0.025	0.913 ± 0.054	1.013 ± 0.043	1.126 ± 0.032	1.342 ± 0.049	1.325 ± 0.044

Những nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng nồng độ hạt từ là 2mg/ml (1mg trong 0.5ml đệm MES), thể tích KT là 8 μ l (1X).

3.5. ỨNG DỤNG KHÁNG THỂ CỐ ĐỊNH VỚI THIẾT BỊ CẢM BIẾN TỪ

3.5.1. Xây dựng đường đặc tuyến cảm biến theo nồng độ kháng nguyên



Hình 3.17. Sự tương quan giữa tín hiệu từ và nồng độ kháng nguyên mức cao >1 ng/ml

Đường chuẩn tuyến tính với nồng độ kháng nguyên đạt độ tin cậy với $R^2 = 0.9969$.

Dải nồng độ kháng nguyên PSA thấp <1 ng/ml nằm trong vùng giới hạn dưới không thể đo được của thiết bị cảm biến từ được chế tạo trong đề tài KC03 [3].

3.5.2. Khảo sát tính đặc hiệu của kháng thể cố định

Bảng 3.13. Kết quả tính đặc hiệu của kháng thể cố định

	ĐC	M1	M2	M3.1	M3.2
Nồng độ Her2 KN trung bình (ng/ml)	0.8125 ±0.036	0.87 ±0.027	0.827 ±0.067		
Nồng độ KN CA15-3 trung bình (ng/ml)	0.7775 ±0.03	0.9125 ±0.073	0.85 ±0.018	1.08 ±0.057	1.08 ±0.067
Nồng độ KN PSA trung bình (ng/ml)	0.8175 ±0.051	8.18 ±0.068	8.197 ±0.063	0.83 ±0.014	74.9 ±0.424

Kết quả phân tích bảng 3.13 cho thấy rằng kháng thể cố định âm tính với các mẫu có chứa kháng nguyên CA15-3 và Her2, hơn nữa trong mẫu huyết thanh bệnh nhân cũng thể hiện âm tính, còn đối với mẫu PSA thì thể hiện giá trị kháng nguyên gần với kết quả xét nghiệm ELISA, điều này chứng tỏ kháng thể cố định đặc hiệu với PSA.

3.5.3. Đánh giá hiệu quả phát hiện kháng nguyên PSA trong huyết thanh bệnh phẩm bằng thiết bị cảm biến từ sử dụng kháng thể cố định

Tiến hành xét nghiệm với 30 mẫu huyết thanh bệnh phẩm cho thấy phép đo của chúng tôi cho kết quả sai lệch dưới 5% so với kết quả ELISA, và sự sai lệch này được lặp lại cho hầu hết các mẫu, thể hiện tính ổn định của hoạt tính kháng thể cố định và độ tin cậy của thiết bị cảm biến, đồng thời đối với mẫu huyết thanh xét nghiệm không cần tiến hành pha loãng, nên tăng độ nhạy của phương pháp đo.

3.5.4. Đo kiểm đánh giá ứng dụng MNPs-KT2 nhờ đơn vị kiểm định độc lập.

Để chứng minh tính ổn định và xác thực phương pháp sử dụng MNPs-KT2 bằng thiết bị cảm biến từ phát hiện kháng nguyên PSA, ngày 15/4/2016, chúng tôi đã nhờ đơn vị kiểm định độc lập kiểm định trực tiếp giám sát quy trình thao tác sử dụng MNPs-KT2 xác định nồng độ kháng nguyên PSA trong 3 mẫu huyết thanh thu được kết quả như bảng 3.15 (đính kèm chứng thư kiểm định):

Bảng 3.15. Kết quả kiểm định với đơn vị xét nghiệm độc lập

Stt	Tên mẫu	Đơn vị tính	Kết quả (PSA)	
			Bệnh viện Ung bướu Đà Nẵng	ĐH Bách khoa- ĐH Đà Nẵng
1	M1: Lương Văn T(75 tuổi)	ng/ml	8.29	8.05
2	M2: Nguyễn Văn L(64 tuổi)	ng/ml	2.97	3.03
3	M3: Võ Văn X(62 tuổi)	ng/ml	0.57	0.53

Bảng 3.15 cho thấy kết quả cũng cho kết quả nồng độ kháng nguyên giữa phép đo của chúng tôi tại Đại học Bách khoa và kết quả ELISA tại bệnh viện Ung bướu gần giống nhau.

Như vậy, sản phẩm MNPs-KT2(SA) của quy trình cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ chúng tôi nghiên cứu đã sử dụng thành công trong bộ kit phát hiện kháng nguyên PSA huyết thanh bằng thiết bị cảm biến từ.

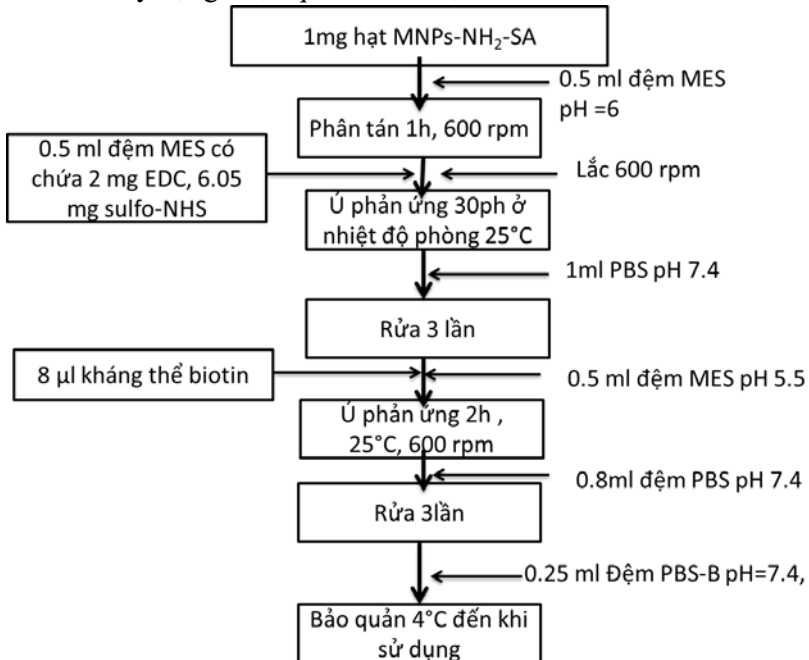
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Qua quá trình thực hiện đề tài “*Nghiên cứu cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ nhằm ứng dụng trong chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến*”, tôi đã đạt được một số kết quả sau:

- Đã lựa chọn được phương pháp cố định kháng thể lên hạt nano sắt từ với bề mặt hạt có chứa nhóm NH_2 : phương pháp sử dụng succinic anhydride làm cầu nối, sử dụng EDC, sulfo-NHS hoạt hóa nhóm COOH gắn kết NH_2 của kháng thể.

- Xây dựng được quy trình cố định như sau:



- Kháng thể cố định MNPs-KT2 đặc hiệu với kháng nguyên PSA, không phản ứng với kháng nguyên Her2 và CA15-3 trong huyết thanh bệnh nhân.

- Đã ứng dụng thành công kháng thể cố định lên hạt nano sắt từ trong bộ kit sinh học phát hiện PSA trong mẫu bệnh phẩm bằng thiết bị cảm biến từ do nhóm chế tạo. Kết quả ghi nhận tương đương với phương pháp xét nghiệm PSA hiện đang được sử dụng tại các bệnh viện, cho thấy triển vọng có thể dùng thiết bị mới chế tạo trong chẩn đoán sớm bệnh Ung thư tiền liệt tuyến nói riêng và các bệnh ung thư nói chung.

2. Kiến nghị

- Nghiên cứu điều kiện và thời gian bảo quản kháng thể cố định

- Nghiên cứu tối ưu hóa qui trình cố định kháng thể bằng qui hoạch thực nghiệm với hàm mục tiêu là hoạt tính kháng thể cố định

- Nghiên cứu hoàn thiện bộ kit phát hiện PSA.