NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG NANO TỪ TRONG PHÂN TÍCH BETA-hCG

STUDY ON BETA- HCG DETERMINATION METHOD USING MAGNETIC NANOPARTICLES

Nguyễn Thị Bích Việt, Tạ Văn Thạo, Nguyễn Bích Ngân*, Nguyễn Viết Minh

TÓM TẮT

Qui trình phân tích protein beta-hCG bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang sử dụng nano từ được nghiên cứu và một số điều kiện thực nghiệm đã được tối ưu hoá. Phương pháp có độ lặp tốt (CV 2,87%) với giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ tương ứng là 3,44 và 14,2 μg/L. Kết quả cho thấy vai trò của hạt nano từ trong việc tăng độ nhạy của phép phân tích. Phương pháp được ứng dụng để các định hàm lượng beta-hCG trong một số mẫu huyết thanh tách từ mẫu máu người, kết quả thu được phù hợp với Kit chuẩn DELFIA®hCG kit (CV dưới 10%).

Từ khoá: *Nano từ, miễn dịch huỳnh quang, beta-hCG.*

ABSTRACT

Different parameters for using modified mangetite nanoparticles in beta-hCG analysis were studied in order to figure out optimal experimental conditions under which a nonlinear regression calibration equation was obtained. Via fluorescence immunoassay method, LOD and LOQ values were determined in this study as 3,44 and 14,2 μg/L. The experiment results showed that the combination of magnetic nanoparticles to the fluorescence immunoassay method allowed detecting beta-hCG at very low concentration with high precision and accuracy (2.87%). Several authetic blood samples of pregnant women were also analyzed using the studied method, which gave results in a good agreement with the one obtained by using standard kit (CV values under 10%).

Keywords: *Mangetite nanoparticles, fluorescence immunoassay, beta-hCG.*

Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội
*Email: nbngan@gmail.com
Ngày nhận bài: 10/11/2018
Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 28/01/2019
Ngày chấp nhận đăng: 25/02/2019

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trước thực trạng bùng nổ của căn bệnh ung thư như hiện nay, việc tầm soát để phát hiện bệnh sớm giúp nâng cao tỉ lệ điều trị thành công là vô cùng có ý nghĩa đối với người bệnh. Trong lĩnh vực khoa học sự sống, các nhà khoa học không ngừng nghiên cứu phát triển các phương pháp phân tích nhằm nâng cao độ nhạy, độ chính xác, độ đặc hiệu với mục đích phát hiện sớm nhất có thể dấu hiệu các loại bệnh ung thư. Trong số đó, phương pháp phân tích miễn dịch, thường được sử dụng trong các phòng phân tích y sinh, là phương pháp sử dụng phản ứng giữa kháng thể hoặc phân tử giống kháng thể với chất cần phân tích. Do tính đặc hiệu của phản ứng rất cao nên phương pháp phân tích này có độ chọn lọc cũng rất cao, có thể ứng dụng với các mẫu có thành phần phức tạp như các dịch sinh học, máu, huyết thanh, nước tiểu… [1,2]

Hạt nano từ đã và đang được được ứng dụng ngày càng rộng rãi như trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là các lĩnh vực có liên quan đến y học như chẩn đoán hình ảnh, chất dẫn thuốc, điều trị ung thư.... và là vật liệu tiềm năng trong lĩnh vực phân tích y sinh [3-5]. Nếu có thể biến tính hạt nano từ cho phù hợp với các kháng thể, biến chúng thành các chất mang kháng thể có thể di chuyển để bắt cặp với các protein đích sau đó cố định chúng bằng từ trường để xác định các tín hiệu dò tương ứng. Nhờ khả năng phân lập và làm sạch các protein chỉ dấu ung thư (hay chỉ dấu một số dị tật bẩm sinh của thai nhi) dễ dàng hơn, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phép phân tích được cải thiện, cho phép xác định chúng trong mẫu thực tế ở nồng độ rất thấp. Ngoài ra, việc sử dụng hạt nano từ trong phân tích mẫu thực cũng cho phép triển khai công nghệ tự động hoá, phân tích nhanh hàng loạt mẫu, tiết kiệm thời gian công sức và chi phí nhưng vẫn đảm bảo tính chính xác.

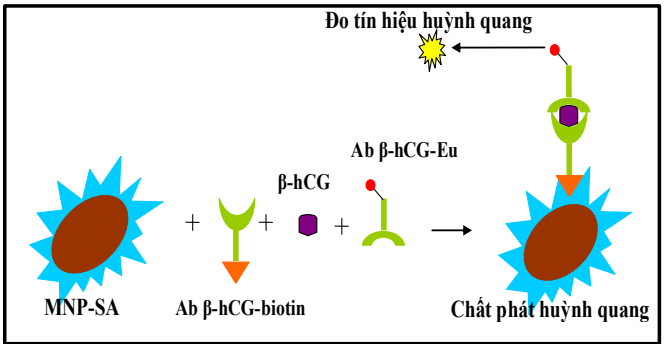
Trong nghiên cứu này, hạt nano từ phủ streptavidin thương mại MNP-SA (chuyên dùng trong cố định các kháng thể đặc hiệu trong phân tích miễn dịch) được nghiên cứu ứng dụng trong xây dựng qui trình xác định beta-hCG theo phương pháp huỳnh quang. hCG là một hooc-môn nội tiết tố được sản sinh bởi nhau thai ở các thai phụ hoặc bởi một số tế bào ung thư [6]. Nếu người không mang thai mà hàm lượng hCG trong máu cao thì có thể dẫn đến chẩn đoán ung thư.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu này đều là dạng tinh khiết dùng cho phân tích y sinh. Các hóa chất sau được mua của hãng Perkin Elmer: dung dịch chuẩn β-hCG (nồng độ 10,9; 107; 510; 1020; 2530; 5060; 6902 μg/L), antibody β-hCG–Eu, chuẩn A (β-hCG 0,00 mg/L), chuẩn F (β-hCG 9,86 mg/L), Kit chuẩn dùng riêng cho phân tích β-hCG và dung dịch rửa. Dung dịch nano từ phủ streptavidin của hãng

ROCHE. Các hoá chất khác của hãng Sigma Aldrich: Biotin, Tris 1x, 1-(2-naphthoyl)-3,3,3-trifluoroaxeton (NTFA). Mẫu máu của các thai phụ được lấy tại Trung tâm xét nghiệm Chemedic.

Quy trình xác định hàm lượng beta-hCG bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang được sơ đồ hoá như trong hình 1. Nồng độ beta-hCG được xác định bằng phương pháp đo cường độ huỳnh quang trên máy miễn dịch huỳnh quang phân lập theo thời gian DELFIA (Perkin Elmer), Trung tâm xét nghiệm Chemedic.



Hình 1. Sơ đồ quy trình phân tích beta-hCG

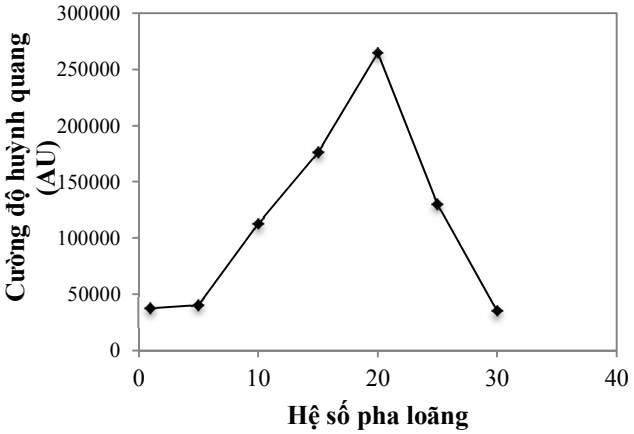
Quy trình tổng hợp kháng thể Ab β-hCG–biotin: Kháng thể β-hCG được biotin hoá bằng cách trộn đều dung dịch biotin 10 mg/mL với dung dịch Ab β-hCG 1 mg/mL theo tỉ lệ mol là 50:1, ủ 10 phút ở 30°C, sau đó sản phẩm Ab β-hCG–biotin được tách bằng cột sắc kí với pha tĩnh là silicagel, pha động là dung dịch Tris 1x.

Quy trình phản ứng miễn dịch (tổng hợp đại phân tử phát huỳnh quang): Dung dịch chứa MNP-SA; Ab β-hCG–biotin (tổng hợp được ở trên), β-hCG (chất phân tích) và Ab β-hCG–Eu (kháng thể dò) được ủ trong khoảng thời gian nhất định ở 30°C; rửa 3-5 lần; chuyển sản phẩm sang giếng polystyrene (loại bỏ dung dịch rửa), thêm dung dịch NTFA; ủ và lắc 400 vòng/phút trong 5 phút; đo tín hiệu huỳnh quang tại bước sóng kích thích 340 nm, bước sóng phát xạ 516 nm. Các thao tác rửa đều được thực hiện với sự hỗ trợ của nam châm vĩnh cửu nên khá dễ dàng và nhanh chóng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ pha loãng kháng thể Ab β-hCG–biotin

Theo sơ đồ phản ứng miễn dịch (hình 1), lượng kháng thể Ab β-hCG–biotin đưa vào không được thừa hay thiếu so với lượng chất cần phân tích (β-hCG) vì cả hai trường hợp đều làm giảm tín hiệu huỳnh quang của sản phẩm. Do đó cần phải khảo sát để xác định một tỉ lệ pha loãng dung dịch Ab β-hCG–biotin thu được từ quá trình tách sắc kí tối ưu. Việc này được thực hiện bằng cách tiến hành phản ứng miễn dịch với các dung dịch Ab β-hCG–biotin có hệ số pha loãng khác nhau và đo tín hiệu huỳnh quang thu được. Kết quả khảo sát được thể hiện trong hình 2. Có thể thấy rằng dung dịch với tỉ lệ pha loãng 1:20 cho tín hiệu huỳnh quang cao nhất do đó tỉ lệ này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

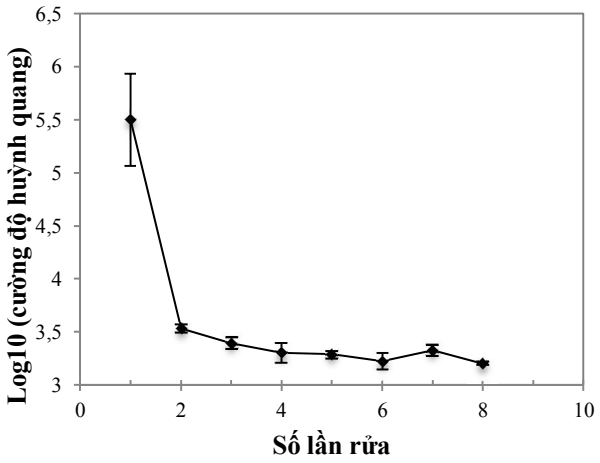


Hình 2. Kết quả khảo sát tỉ lệ pha loãng

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của số lần rửa

Hạt nano từ có kích thước rất nhỏ nên tác động của lực từ lên hạt nano từ cũng rất nhỏ, làm cho tốc độ sa lắng cũng giảm theo kích thước hạt. Do đó khi rửa càng nhiều lần, nguy cơ thất thoát hạt nano từ theo nước rửa càng lớn. Tuy nhiên, nếu quá trình rửa không loại bỏ hết được các kháng thể dò còn dư thì sẽ gây sai số dương cho phép phân tích. Vì vậy cần khảo sát để tìm ra số lần rửa tối ưu bằng cách đo cường độ huỳnh quang của nước rửa sau mỗi lần rửa (ở giai đoạn rửa sản phẩm cuối cùng). Kết quả đo cường độ huỳnh quang theo số lần rửa được biểu diễn trong hình 3.

Có thể thấy rằng sau lần rửa thứ 3 tín hiệu huỳnh quang của nước đã rất thấp và gần như ổn định. Điều này chứng tỏ lượng kháng thể dò đã được loại bỏ hết sau 3 lần rửa.



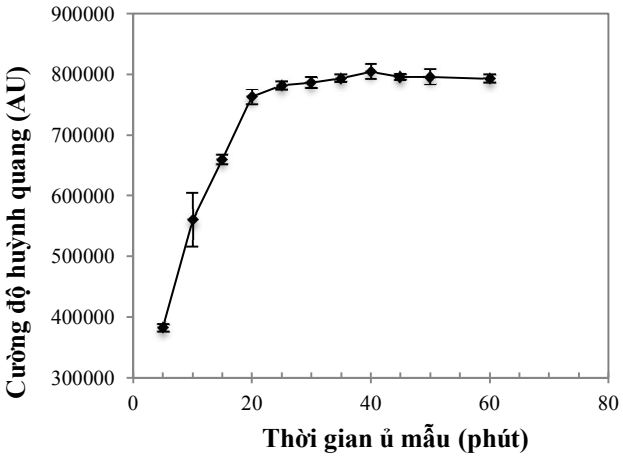
Hình 3. Ảnh hưởng của số lần rửa sản phẩm

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ mẫu

Dù phản ứng miễn dịch rất đặc hiệu và hằng số tốc độ phản ứng rất lớn nhưng 4 chất tham gia phản ứng đều có khối lượng phân tử rất lớn, khiến chúng di chuyển chậm và một khi đã bắt cặp với nhau chúng càng trở nên cồng kềnh hơn, khó bắt cặp với nhau hơn. Do vậy phản ứng miễn dịch này đòi hỏi thời gian nhất định (gọi là thời gian ủ mẫu). Thí nghiệm khảo sát thời gian ủ mẫu tối ưu được thực hiện

bằng cách tiến hành phản ứng ở cùng điều kiện nhưng thời gian ủ khác nhau, so sánh tín hiệu huỳnh quang của sản phẩm thu được. Kết quả đo cường độ huỳnh quang được biểu diễn trong hình 4.

Có thể nhận thấy ban đầu khi tăng thời gian ủ mẫu từ 5 đến 20 phút, cường độ huỳnh quang tăng nhanh và tuyến tính theo thời gian. Sau đó, cho đến 40 phút, cường độ tín hiệu tiếp tục tăng nhẹ nhưng không tuyến tính nữa. Từ 40 phút ủ trở đi, tín hiệu đạt cực đại và có xu hướng giảm nhẹ. Trên thực tế, sau thời gian ủ 20 phút cường độ tín hiệu đã rất lớn và khá ổn định nên, để tối ưu hoá thời gian của phép phân tích, khoảng thời gian ủ mẫu 20 phút sẽ được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ủ mẫu

3.4. Khảo sát độ lặp của phép phân tích

Điều kiện tối ưu đã khảo sát được ở trên để thực hiện phản ứng miễn dịch là: tỉ lệ pha loãng dung dịch Ab β-hCG–biotin 1:20, thời gian ủ mẫu 20 phút, rửa sản phẩm 3 lần. Với điều kiện này, độ lặp của phép phân tích đã được khảo sát bằng cách tiến hành song song 10 phản ứng miễn dịch trên chuẩn F (dung dịch β-hCG 9,86 mg/L) với mong muốn kết quả cường độ huỳnh quang thu được có hệ số biến thiên CV không quá ±10%.

Kết quả đo cường độ huỳnh quang và đánh giá thống kê của 10 mẫu chuẩn F được trình bày trong bảng 1. Số liệu cho thấy phương pháp nghiên cứu cho kết quả có độ lặp rất tốt (CV = 2,87%).

Bảng 1. Khảo sát độ lặp của phép phân tích

STT	Cường độ huỳnh quang
1	668438
2	696979
3	674751
4	682945
5	671602
6	674749
7	668613
8	667668
9	670170
10	674543
TB	675046
S	22930
CV	2,87%

3.5. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Việc xác định độ nhạy của phép phân tích cũng là một bước để kiểm tra chất lượng thuốc thử có đạt được yêu cầu đề ra hay không. Thí nghiệm khảo sát độ nhạy của phép phân tích được thực hiện trên 10 mẫu trắng (chuẩn A) với mong muốn tín hiệu huỳnh quang thu được chỉ là tín hiệu nền. Tiến hành xử lí thống kê số liệu thu được các giá trị giới hạn phát hiện LOD = TB + 3S và giới hạn định lượng LOQ = TB + 10S, với TB là giá trị trung bình của tín hiệu huỳnh quang, S là độ lệch chuẩn.

Bảng 2. Khảo sát độ nhạy của phép phân tích

Mẫu số	Cường độ huỳnh quang (AU)
1	5599
2	5619
3	5552
4	5319
5	5602
6	4981
7	5199
8	5377
9	5501
10	5635
TB	5438
SD	217,4
CV (%)	4,0
LOD	3,44 (µg/L)
LOQ	14,2 (µg/L)

Kết quả đánh giá độ nhạy của phép phân tích được trình bày trong bảng 2. Giá trị CV = 4% chứng tỏ kết quả khảo sát độ nhạy theo phương pháp này là đáng tin cậy.

Kết quả trong bảng 2 cho thấy, với mẫu trắng (nồng độ β-hCG bằng 0), cường độ huỳnh quang đo được là rất thấp và đây được coi là tín hiệu nền của phương pháp.

3.6. Khảo sát độ đặc hiệu của phép phân tích

Để khảo sát độ đặc hiệu của phép phân tích, chúng tôi tiến hành phản ứng theo quy trình với các điều kiện tối ưu đã khảo sát nhưng thay β-hCG bằng các chuẩn hCG, PAPP-A và AFP. Nếu cường độ huỳnh quang thu được chỉ tương đương với tín hiệu nền thì chứng tỏ thuốc thử chỉ đặc hiệu với β-hCG. Kết quả khảo sát với các chuẩn free-hCG, PAPP-A và AFP được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu với các chuẩn free hCG, PAPP-A và AFP

Chuẩn	Cường độ huỳnh quang (AU)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
Free-hCG	3701	3342	3622	3555
PAPP - A	4164	3945	3865	3991
AFP	2345	2363	2355	2354

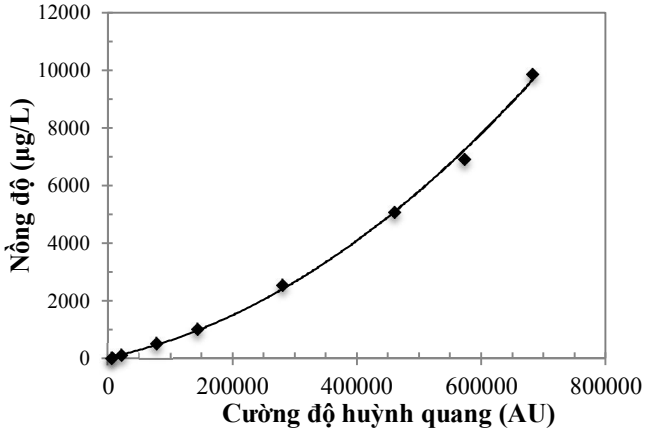
Từ số liệu thu được ở bảng 2 và 3, có thể thấy tín hiệu huỳnh quang đo được với các chuẩn hCG, PAPP-A và AFP đều thấp hơn giá trị giới hạn phát hiện LOD đối với β-hCG, tức là chỉ tương đương với tín hiệu nền của phương pháp (bảng 2). Điều này đã chứng minh phương pháp phân tích xây dựng được có độ đặc hiệu cao đối với β-hCG. Như vậy, phương pháp này hoàn toàn có thể áp dụng được để phân tích β-hCG trong các mẫu máu thực tế.

3.7. Xây dựng đường chuẩn xác định β-hCG bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang

Để xây dựng đường chuẩn chúng tôi thực hiện phản ứng miễn dịch với 9 dung dịch chuẩn với nồng độ β-hCG như trong bảng 4, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình, cuối cùng xử lí thống kê số liệu thu được bằng phần mềm OriginPro 8.0.

Bảng 4. Xây dựng đường chuẩn xác định β-hCG

Nồng độ β-hCG (mg/L)	Cường độ huỳnh quang (AU)				CV(%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	
0	5599	5619	5552	5590	0,62
10,9	7262	6981	7168	7137	2,00
107	20491	20868	21019	20793	1,31
510	77315	78220	78086	77874	0,63
1020	141722	142205	146001	143309	1,64
2530	276803	285163	278009	279992	1,61
5060	459330	458879	460956	459722	0,24
6902	577822	570669	571672	573388	0,68
9860	681415	674715	691621	682584	1,25



Hình 5. Đường chuẩn xác định β-hCG

Hình 5 biểu diễn đường chuẩn xác định nồng độ β-hCG theo phương pháp miễn dịch huỳnh quang xây dựng được trên cơ sở hồi quy phi tuyến tính là $C_{\beta\text{-}hCG} = 10^{-8}\ I + 0{,}0045\ I + 24{,}729$ với $R^2 = 0{,}99823$, trong đó I là cường độ huỳnh quang.

3.8. Phân tích hàm lượng β-hCG trong mẫu máu thực tế

Để kiểm tra phép phân tích, chúng tôi tiến hành phân tích với 6 mẫu máu thật của các thai phụ ở giai đoạn thai kì từ tuần thứ 15 đến tuần thứ 20, đồng thời so sánh kết quả thu được với kết quả đo bằng bộ Kit chuẩn (DELFIA®hCG kit, Perkin Elmer). Kết quả xác định nồng độ β-hCG trong các mẫu thật này được thể hiện trong bảng 5.

Có thể nhận thấy kết quả phân tích sử dụng Kit chế tạo được là tương đương với khi dùng Kit chuẩn, mức độ sai lệch dưới 10% (khoảng sai số cho phép). Điều này chứng tỏ phương pháp nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn có thể áp dụng để phân tích nồng độ β-hCG trong các mẫu máu.

Bảng 5. Kết quả phân tích mẫu thực

TT	$I_{huỳnh\ quang}$ (AU)	Nồng độ β-hCG (µg/L)		CV (%)
		Phương pháp nghiên cứu	Kit chuẩn	
1	199842	1323,4	1400,7	-5,5
2	214619	1451,1	1506,7	-3,7
3	113162	662,0	708,7	-6,6
4	307281	2351,7	2578,1	-8,8
5	153342	949,9	1053,0	-9,8
6	323214	2523,9	2718,4	-7,2

4. KẾT LUẬN

Đã khảo sát được điều kiện tối ưu để thực hiện phản ứng miễn dịch huỳnh quang phân tích nồng độ β-hCG: tỉ lệ pha loãng dung dịch Ab β-hCG–biotin 1:20, thời gian ủ mẫu 20 phút, rửa sản phẩm 3 lần. Việc đánh giá độ lặp, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp đều cho kết quả tốt, cho thấy khả năng áp dụng phương pháp để phân tích các mẫu thực tế. Kết luận này cũng đã được khẳng định với kết quả phân tích các mẫu máu của thai phụ trong giai đoạn thứ hai của thai kì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Ibrahim A. Darwish, 2006. *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*. Int J Biomed Sci. 2(3), 217–235.

[2]. W. Tian, L. Wang, H. Lei, Y. Sun Z. Xiao, 2018. *Antibody production and application for immunoassay development of environmental hormones: a review*. Chem. Biol. Technol. Agric. 5:5.

[3]. L. Mohammed, H. G. Gomaa, D. Ragab, J. Zhu, 2017. *Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review*. Particuology 30, 1-14.

[4]. S. Chaleawlert-umpon, N. Pimpha, 2012. *Preparation of magnetic polymer microspheres with reactive epoxide functional groups for direct immobilization of antibody*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 414, 66-74.

[5]. Emma Ericsson, 2013. *Biosensor surface chemistry for oriented protein immobilization and biochip patterning*. Linköping Studies in Science and Technology Licentiate, Thesis No. 1573.

[6]. R. Hoermann, G. Spoettl, R. Moncayo, K. Mann, 1990. *Evidence for the Presence of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Free β-Subunit of hCG in the Human Pituitary*. J Clin Endocrinol Metab 71, 179-186