

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Quang Tiến

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO, ĐẶC TRƯNG HỆ VI LƯU TÍCH HỢP.
ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG CHO PHÂN TÍCH
VÀ TỔNG HỢP VẬT LIỆU**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Vật liệu điện tử

Mã số: 9440123

Hà Nội – 2026

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: GS.TS Trần Đại Lâm - Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS Phan Huy Hoàng, Đại học Bách khoa Hà Nội

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ, ngày tháng năm 202

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Sự bùng phát COVID-19 cho thấy cần chuyển từ mô hình y tế tập trung sang các giải pháp chẩn đoán phân tán, tại chỗ, dựa trên thiết bị nhỏ gọn nhưng vẫn chính xác và nhạy. Các hệ POCT vì vậy được quan tâm mạnh, đặc biệt là những hệ phát hiện acid nucleic bằng phương pháp điện hóa kết hợp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP, do dễ thu nhỏ, chi phí thấp và phù hợp vùng thiếu nguồn lực. Công nghệ vi lưu cho phép tích hợp toàn bộ quy trình chuẩn bị mẫu – khuếch đại – phát hiện trên một chip, giúp giảm thể tích mẫu, rút ngắn thời gian xét nghiệm và triển khai ngoài phòng thí nghiệm. Trong hướng này, cảm biến sinh học điện hóa (nhất là cảm biến miễn dịch và cảm biến NA) được ưu tiên nhờ độ nhạy, độ chọn lọc cao, khả năng dùng một lần và tiềm năng tự động hóa khi tích hợp với chip vi lưu. Vì vậy, nghiên cứu tập trung thiết kế và chế tạo thiết bị vi lưu tích hợp cảm biến điện hóa, hướng tới ứng dụng trong các xét nghiệm y-sinh và chẩn đoán tại điểm chăm sóc.

Mục tiêu luận án

(1) Nghiên cứu chế tạo và tích hợp cảm biến điện hóa với hệ vi lưu tối ưu cho phản ứng và phát hiện sản phẩm khuếch đại LAMP.

(2) Xây dựng mô hình tích hợp điện cực, nghiên cứu ứng dụng thiết bị ngoại vi cải tiến nhằm thu nhỏ hệ thống, giảm thể tích mẫu.

(3) Phát triển quy trình đo điện hóa không gắn mẫu (label-free) sử dụng cảm biến sinh học để phát hiện thành phần sinh học, với khả năng tùy biến theo yêu cầu cụ thể.

Cách tiếp cận, phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu thực nghiệm là phương pháp nghiên cứu chính của luận án. Cách tiếp cận trong quá trình nghiên cứu là xem xét các kết quả thực nghiệm từ đó đưa ra đánh giá ban đầu, kết hợp với lý thuyết và các tài liệu tham khảo, giải thích, so sánh, đưa ra nhận định chính xác và tối ưu quy trình thực nghiệm.

Nội dung của luận án:

Để giải quyết được mục tiêu của đề tài, luận án tập trung nghiên cứu ba nội dung chính:

Nội dung 1: Thiết kế, chế tạo thiết bị vi lưu tích hợp để theo dõi điện hóa thời gian thực quá trình khuếch đại acid nucleic bằng LAMP, sử dụng sự xen cài giữa sản phẩm DNA và đầu dò oxi-hoá khử trong pha lỏng.

Nội dung 2: Chế tạo cảm biến rGO-PANi để theo dõi sự thay đổi pH trong suốt quá trình LAMP; màng rGO được tạo bằng khử điện hóa graphene oxit, sau đó mạ điện PANi, và dùng phép đo thế mạch hở (OCP) để phát hiện DNA khuếch đại.

Nội dung 3: Thiết kế, tối ưu hệ vi lưu tích hợp sẵn điện cực, đế nhiệt và kênh vi lưu cho LAMP và đo điện hóa; bao gồm mô phỏng kênh, đế nhiệt Pt và chế tạo hệ nhằm hướng tới thiết bị xét nghiệm tại chỗ.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Luận án hướng tới một nền tảng phân tích thu nhỏ, chi phí thấp, vẫn đảm bảo độ nhạy và độ chọn lọc, giúp rút ngắn thời gian xét nghiệm và giảm lượng mẫu, phù hợp triển khai ở khu vực thiếu điều kiện xét nghiệm tập trung. Hệ vi lưu PDMS tích hợp cảm biến điện hóa được dùng để theo dõi phản ứng LAMP, với các kỹ thuật quét thế vòng và thế không đổi để khảo sát tính chất điện hóa.

Đóng góp mới

Luận án đã thiết kế và chế tạo được hệ kênh phản ứng kích thước nhỏ gắn với hệ điện cực có thể nối trực tiếp với mạch đo, qua đó giảm lượng mẫu và tăng tỉ lệ tín hiệu/nhiều. Việc kết hợp vi lưu với các vật liệu dẫn như graphene, polyanilin, vật liệu 2D và nano-kim loại cho phép vừa tổng hợp vật liệu ngay trên chip, vừa dùng chúng làm điện cực cảm biến hoặc phân tử chức năng – một hướng nghiên cứu còn mới ở Việt Nam.

Bố cục và công bố

Luận án dài 101 trang (không kể mục lục và tài liệu tham khảo), gồm phần Mở đầu; Chương 1 – Tổng quan; Chương 2 – Đối tượng và phương pháp; Chương 3 – Kết quả và thảo luận; phần Kết luận. Các kết quả chính đã được công bố trong 5 công trình khoa học, gồm 4 bài báo trên tạp chí ISI và 1 báo cáo hội nghị quốc tế.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Chip sinh học và hệ thống vi cơ lỏng (Biochip and Microfluidics)

Chip sinh học và hệ vi cơ lỏng cho phép thu nhỏ toàn bộ quy trình phân tích – từ chuẩn bị mẫu, phản ứng đến phát hiện tín hiệu – lên một nền tảng vi mô, khắc phục hạn chế về thời gian, chi phí và hạ tầng của các kỹ thuật chẩn đoán truyền thống như nuôi cấy, PCR hay ELISA. Chip sinh học tích hợp các phần tử sinh học hoạt tính (DNA, kháng thể, enzyme...) trên nền rắn, có thể thực hiện đồng thời hàng nghìn phản ứng, ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, an toàn thực phẩm, giám sát môi trường, an ninh sinh học và đặc biệt là y học cá thể hoá. Hệ vi lưu, dựa trên các kênh cỡ micromet với dòng chảy tầng và các hiệu ứng vi mô (mao dẫn, điện thẩm, khuếch tán...), cho phép thao tác chính xác thể tích chất lỏng cực nhỏ, đồng thời đóng vai trò “vi lò phản ứng” tối ưu cho tổng hợp và xử lý vật liệu, nhất là hạt nano, nhờ kiểm soát tốt thời gian lưu và gradient nhiệt – nồng độ.

Về chế tạo, các thế hệ đầu dùng thủy tinh/silicon dần được thay thế bởi polymer như PDMS, PC, PMMA và cả giấy nitrocellulose, giúp giảm giá thành và tăng tính linh hoạt; xu hướng hiện nay là kết hợp đa vật liệu và tận dụng in 3D để tạo kiến trúc phức tạp. Hệ thống tích hợp vi lưu – biochip (lab-on-a-chip) đã chứng minh hiệu quả trong POCT: tự động hóa ly giải, tách chiết, khuếch đại (PCR, LAMP) và phát hiện (điện hoá, huỳnh quang, plasmon) trên một chip nhỏ, điển hình như GeneXpert hay các chip RT-LAMP phát hiện SARS-CoV-2 với lượng mẫu và thời gian xét nghiệm giảm mạnh so với PCR ống nghiệm.

Tuy nhiên, công nghệ vẫn đối mặt với các thách thức như nhiễu nền từ mẫu sinh học phức tạp, hấp phụ không đặc hiệu lên PDMS, thẩm khí ảnh hưởng enzyme, biến thiên giữa các lô chế tạo và chi phí sản xuất hàng loạt. Các hướng phát triển tương lai tập trung vào chip lai quang-điện tử, tích hợp AI xử lý dữ liệu, organ-on-a-chip mô phỏng cơ quan người và in 3D đa vật liệu để chế tạo vi mạch thế hệ mới.

1.2. Cảm biến sinh học điện hóa

1.2.1. Phân loại cảm biến sinh học

Cảm biến sinh học điện hóa là phần lõi của hệ vi lưu phân tích, vì các vi điện cực vàng, carbon, ITO hoặc điện cực in được tích hợp trực tiếp trong kênh cho phép đo dòng, thế, trở kháng với thể tích mẫu rất nhỏ và theo thời gian thực. Nhờ kích thước micro, lớp khuếch tán mỏng và đường đi khuếch tán ngắn, các vi điện cực cho tỷ lệ tín hiệu/nhiều cao và đáp ứng nhanh, đồng thời dễ ghép với mạch đo cầm tay (potentiostat mini, NFC, Bluetooth) để hình thành các hệ lab-on-a-chip di động.

Cảm biến sinh học có thể phân thành ba nhóm chính theo cơ chế chuyển đổi: quang học (như SPR), từ tính (dựa trên hạt nano từ) và điện hóa; trong đó, nhóm điện hóa được dùng rộng rãi nhờ chi phí thấp, dễ thu nhỏ và thích hợp với mẫu phức tạp. Cảm biến điện hóa sử dụng phần tử nhận biết sinh học (enzyme, kháng thể, aptamer, DNA) gắn trên điện cực làm việc, chuyển tương tác sinh học thành tín hiệu dòng, thế hoặc trở kháng, được đo bằng các phương pháp ampêmetry, potentiometry hay EIS. Hiệu năng và lựa chọn kỹ thuật phụ thuộc vào độ nhạy, giới hạn phát hiện, kích thước – khả năng di động của thiết bị, mức độ tiền xử lý mẫu, thời gian đáp ứng và chi phí tổng thể; trong bối cảnh POCT, cảm biến điện hóa tỏ ra nổi trội nhờ khả năng sản xuất điện cực in giá rẻ, dùng một lần, có thể tích hợp với vi lưu và thiết bị di động.

1.2.2. Phân tích điện hóa

Phân tích điện hóa nói chung dựa trên hệ ba điện cực (WE, RE, CE) và potentiostat điều khiển điện thế, ghi dòng; các tương tác sinh học làm thay đổi dòng faradaic hoặc trở kháng tại WE, từ đó định lượng nồng độ chất đích. Những năm gần đây, số lượng công bố về phân tích điện hóa và cảm biến sinh học điện hóa tăng rất nhanh, đặc biệt với vật liệu nano (graphene, MXene, nanocomposite) và cấu trúc tích hợp vi lưu, cho thấy tiềm năng lớn cho chẩn đoán y sinh, theo dõi bệnh và cảm biến môi trường thế hệ mới.

1.2.3. Kỹ thuật đo trong cảm biến điện hoá

Các kỹ thuật đo trong cảm biến sinh học điện hóa có thể tóm tắt ngắn gọn như sau:

Nhiều phương pháp được dùng, nhưng luận án tập trung vào ba kỹ thuật chính: CV, EIS và DPV để phát hiện sản phẩm khuếch đại acid nucleic.

CV quét điện thế lên xuống dạng tam giác và ghi dòng, tạo đường voltammogram với đỉnh oxy hóa/khử; chiều cao và vị trí các đỉnh phản ánh nồng độ và tính thuận nghịch của chất chỉ thị redox (như MB, cặp $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$), rất hữu ích để khảo sát biến đổi bề mặt điện cực và cơ chế phản ứng.

EIS áp một nhiễu AC nhỏ quanh điện thế cố định, đo tổng trở theo tần số và mô hình hóa bằng mạch tương đương; thông số quan trọng nhất là điện trở chuyển điện tích R_{ct} , tăng lên khi bề mặt được phủ/ lai hóa DNA, cho phép phát hiện không gắn nhãn với giới hạn phát hiện tới mức fM.

DPV dùng các xung thế nhỏ chồng lên điện thế quét, đo hiệu dòng trước-sau xung để loại bỏ gần như toàn bộ dòng dung, tạo các đỉnh dòng sắc và nhạy, phù hợp định lượng các chất chỉ thị redox liên quan đến DNA ở nồng độ rất thấp.

Việc chọn và tối ưu từng kỹ thuật (dải thế, biên độ và thời gian xung, biên độ AC, tần số...) là yếu tố quyết định để đạt độ nhạy, độ chính xác và giới hạn phát hiện mong muốn trong thiết kế cảm biến sinh học điện hóa cho acid nucleic.

1.2.4. Cảm biến điện hóa trên nền thiết bị vi lưu

Trong cảm biến sinh học, việc tích hợp điện cực vào chip vi lưu cho phép thực hiện toàn bộ quy trình phân tích (đưa mẫu, xử lý, đo tín hiệu) trên một nền tảng nhỏ gọn, giảm thể tích mẫu, rút ngắn thời gian và tăng độ nhạy; các cấu trúc phổ biến gồm hệ vi kênh và vi lỏng trên giấy, có thể dùng dòng liên tục hoặc giọt rời rạc để hạn chế nhiễm chéo. Các điện cực được chế tạo tại chỗ bằng phun xạ – quang khắc hoặc gắn từ bên ngoài vào, tạo linh hoạt

trong thiết kế và giúp hạ giá thành khi sản xuất hàng loạt, đồng thời có thể kết hợp các mô-đun chuẩn bị mẫu (vi lọc, tách tế bào bằng khuếch tán hoặc dielectrophoresis) và các cơ chế điều khiển dòng thụ động (mao dẫn) hay chủ động (bơm, nhấn tay).

1.2.5. Tình hình nghiên cứu cảm biến điện hóa tích hợp hệ vi lưu trong nước.

Ở Việt Nam, nghiên cứu cảm biến sinh học điện hóa phát triển chủ yếu quanh các nhóm tại ĐH Bách khoa Hà Nội, ĐHQG TP.HCM, Viện Khoa học vật liệu và một số trường/viện khác, với nhiều hệ cảm biến dựa trên điện cực rỗng hoặc vật liệu nano để phát hiện thuốc trừ sâu, kim loại nặng, glucose, cholesterol, ung thư, HIV, aflatoxin và DNA/virus. Tuy nhiên, các hệ ****vi lưu tích hợp**** cảm biến điện hóa còn rất ít; mới chỉ có một số công trình bước đầu chế tạo kênh vi lỏng trên giấy hoặc PDMS kết hợp cảm biến cho ELISA hay phát hiện DNA, cho thấy đây vẫn là hướng nghiên cứu mới, còn nhiều dư địa phát triển trong nước.

1.3. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP

Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic là nền tảng quan trọng để phát hiện vi sinh vật nhờ độ chọn lọc và độ nhạy cao, trong đó có hai hướng chính: PCR và các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt. PCR sử dụng chu trình ba nhiệt độ (biến tính – gắn mồi – kéo dài) với enzyme chịu nhiệt như Taq, cho phép nhân lên tới hàng tỉ bản sao gen đích nhưng cần máy biến nhiệt đắt tiền, nhiều thiết bị phụ trợ và khó triển khai ngoài phòng thí nghiệm.

Các kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt, tiêu biểu là LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) và RPA, khắc phục hạn chế này nhờ thực hiện phản ứng ở một nhiệt độ cố định khoảng 60–65 °C, yêu cầu năng lượng và thiết bị đơn giản hơn. Với LAMP, enzyme như Bst/Bsm polymerase có hoạt tính tách sợi, phối hợp với 2–3 cặp mồi nhận biết 6–8 vùng trên gen đích, tạo lượng DNA sợi đôi rất lớn chỉ trong 40–60 phút, sản phẩm có dạng cấu trúc vòng – bậc thang và có thể phát hiện trực tiếp bằng

mất thường qua thuốc nhuộm mà không cần điện di. Nhờ vậy, LAMP có giới hạn phát hiện thấp hơn PCR/RT-PCR, thời gian phản ứng ngắn, ít nguy cơ nhiễm chéo do toàn bộ quá trình khuếch đại và đọc kết quả diễn ra trong một ống, đồng thời có thể mở rộng sang khuếch đại RNA khi bổ sung enzyme phiên mã ngược; đây là lý do LAMP đặc biệt phù hợp cho các ứng dụng xét nghiệm hiện trường và trong điều kiện thiếu hạ tầng.

1.3.1. Nguyên lý của kỹ thuật LAMP

Kỹ thuật LAMP sử dụng 4–6 môi đặc biệt nhận diện 6–8 vùng trên gen đích, cùng enzyme Bst polymerase, thực hiện khuếch đại DNA ở một nhiệt độ cố định khoảng 55–65 °C với hiệu suất rất cao (tới 10^9 – 10^{10} bản sao trong 15–60 phút).

1.3.2. Thành phần cơ bản của phản ứng LAMP

Thành phần phản ứng gồm DNA khuôn (không cần tinh sạch cao), bộ môi LAMP, dNTP, đệm và thuốc nhuộm chỉ thị (SYBR Green, HNB, calcein, xanh malachite...) để quan sát sản phẩm trực tiếp qua độ đục hoặc màu.

1.3.3. Cơ chế phản ứng LAMP

Cơ chế gồm ba giai đoạn: tạo “DNA gốc vòng” (stem-loop) từ gen đích, chu kỳ tái bản – kéo dài liên tục nhờ các môi trong FIP/BIP trên cấu trúc vòng, rồi lặp lại nhiều lần để tạo hỗn hợp DNA vòng gấp khúc với chiều dài rất lớn.

1.3.4. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật LAMP

Ưu điểm nổi bật của LAMP là không cần máy PCR chu kỳ nhiệt đắt tiền, chỉ cần thiết bị giữ nhiệt ổn định; phản ứng đẳng nhiệt, thời gian xét nghiệm nhanh, độ nhạy và đặc hiệu cao, có thể đọc kết quả bằng mắt thường và chấp nhận DNA khuôn tách chiết đơn giản. Nhược điểm là vẫn phải tách chiết acid nucleic, dễ bị nhiễm chéo do độ nhạy cao và chi phí cao hơn so với các phương pháp hình thái hoặc ELISA.

Tại Việt Nam, LAMP và RT-LAMP đã được ứng dụng để phát hiện

nhanh nhiều mầm bệnh trên vật nuôi, cây trồng và trong y tế (*E. coli* O157:H7, bệnh đốm trắng tôm, *Phytoplasma* trên sắn, vàng lá có múi, virus dại, viêm não Nhật Bản, Dengue...), một số đã phát triển thành kit thương mại như bộ kit LAMP chẩn đoán virus trên tôm và kit RT-LAMP Dengue trong nước.

1.3.5. Tích hợp kỹ thuật LAMP trên thiết bị vi lưu

Tích hợp LAMP vào thiết bị vi lưu cho phép thực hiện khuếch đại acid nucleic nhạy, đặc hiệu mà không cần máy chu trình nhiệt, rất phù hợp cho chẩn đoán tại chỗ. Nhiều nền tảng đã được phát triển, từ chip kênh vi lưu tích hợp tách chiết DNA bằng hạt từ cho tới các hệ “sample-in-answer-out” ngay trong đầu tip micropipette, nơi toàn bộ quá trình chiết, khuếch đại và đọc huỳnh quang diễn ra trong một thể tích rất nhỏ. Các giải pháp sáng tạo khác dùng RT-LAMP kết hợp nguồn nhiệt hoá học và que thử dòng chảy ngang hoặc que thử thai thương mại để phát hiện HIV-1 hay SARS-CoV-2 mà không cần nguồn điện, chỉ đọc kết quả bằng mắt thường qua sự xuất hiện/mất đi của vạch trên dải giấy. Bên cạnh phát hiện định tính, LAMP còn được triển khai ở dạng “digital LAMP” trong các giọt nước-trong-dầu để định lượng tuyệt đối gene kháng thuốc, cũng như trên thiết bị giấy đo chiều dài vạch màu phụ thuộc nồng độ DNA, cho phép bán định lượng mầm bệnh với cấu hình giá rẻ, dùng một lần và rất cơ động.

Trên cơ sở tổng quan tình hình nghiên cứu cảm biến sinh học điện hóa trên thế giới và trong nước, chúng ta có thể nhận thấy một số định hướng nghiên cứu trọng tâm sau đây:

Hướng thứ nhất tập trung vào thiết kế và chế tạo hệ điện cực, vì vật liệu (Au, Pt, các dạng carbon) và công nghệ chế tạo quyết định trực tiếp độ nhạy, chi phí và khả năng gắn các phân tử sinh học lên bề mặt cảm biến. Hướng thứ hai là tích hợp cảm biến điện hóa với hệ vi lưu/vi buồng phản ứng để thu nhỏ hệ thống, giảm lượng mẫu, cải thiện tỷ lệ tín hiệu/nhiều và tiến tới các thiết bị phân tích di động dùng tại hiện trường; đây là xu thế quốc tế

nhưng vẫn còn khá mới ở Việt Nam. Hướng thứ ba là phát triển các quy trình đo điện hóa chuyên biệt cho từng loại thành phần sinh học đích, tối ưu hoá kỹ thuật đo trong các nền mẫu phức tạp làm cơ sở cho thiết bị chuyên dụng. Để triển khai hiệu quả ba định hướng này cần sự hợp tác liên ngành giữa hoá học, vật lý, điện tử, sinh học và khoa học vật liệu, phù hợp với xu thế nghiên cứu tích hợp thiết bị điện hoá – vi lưu trên thế giới.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu 1: Chế tạo cảm biến điện hóa trên hệ vi lưu sử dụng methylene blue là đầu dò oxy hóa khử để phát hiện virus HBV

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các xét nghiệm chẩn đoán tại chỗ chính xác đóng một vai trò quan trọng trong việc quản lý bệnh nhân và kiểm soát hầu hết các bệnh truyền nhiễm. Để đạt được điều này, việc sử dụng cùng một thiết bị sinh học cầm tay thực hiện cả việc xử lý mẫu, phân tích mẫu và đọc kết quả là một cách tiếp cận lý tưởng. Trong nội dung nghiên cứu này, luận án sẽ hướng đến việc nghiên cứu, chế tạo một thiết bị vi lưu tích hợp để theo dõi điện hóa thời gian thực về sự khuếch đại axit nucleic bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP. Sự xen kẽ giữa sản phẩm DNA khuếch đại và đầu dò oxy hóa khử tự do trong dung dịch pha loãng được sử dụng để theo dõi số lượng bản sao DNA. Toàn bộ quá trình chẩn đoán được hoàn thành trong vòng 70 phút.

2.1.2. Vật liệu và phương pháp

2.1.2.1. Vật liệu, hóa chất

Methylene blue (MB), dung dịch muối đệm phosphate (PBS) được chuẩn bị và pha loãng bằng nước siêu tinh khiết (18,3 MΩ), Bộ khuếch đại DNA Loopamp), Polydimethylsiloxane (PDMS), Cảm biến điện hóa SPE (AC1.RS1).

2.1.2.2. Chuẩn bị mẫu và tách chiết DNA

Các mẫu bệnh phẩm (mẫu máu) được thu thập từ những bệnh nhân nội trú nghi ngờ có HBV nhập viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương (NHTD) vào tháng 8 năm 2015. Tất cả các mẫu đã được xét nghiệm trước đó tại bệnh viện để rút ra kết luận đầu tiên về tình trạng dương tính. Máu và các mẫu huyết thanh được bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện xét nghiệm. DNA của virus được chiết xuất từ 50 μl huyết thanh bằng bộ kit mini QIAmp DNA (QIAGEN GmbH, Đức), theo khuyến nghị của nhà sản xuất. DNA được hòa tan trong 50 μl nước không có DNase.

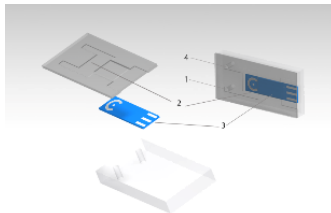
2.1.2.3. Quy trình chế tạo

Bảng 2.1. Danh sách trình tự các primer thiết kế cho LAMP

F3	TCAACCCCATCAAGGACCA
B3	GCCTGAGGATGACTGTCTCT
FIP	CCAAAACACCGCCGTGTGGAAGCCAACC AGGTAGGAGTG
BIP	CAGGCTCAGGGCATGTTGACCTAGGCTGCC TTCCTGACT
LF	AACCCTGGCCCGAATGCTC
LB	GTCAACAATTCTCCTCCTGCC

2.1.2.4. Thiết kế và chế tạo thiết bị vi lưu tích hợp cảm biến điện hóa

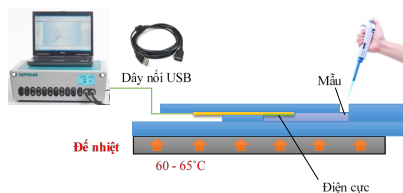
Thiết bị vi lưu, điện hóa, LAMP (LAMP- EC – MF) được thiết kế với các yếu tố chính sau: (1,4) đầu vào và đầu ra, (2) buồng phản ứng và (3) cảm biến. Thể tích của buồng phản ứng hình chữ nhật của chúng tôi là 20 μl (Hình 2.2).



Hình 2.2. Thiết kế ý tưởng của slip-chip LAMP-EC-MF

2.1.3. Nội dung nghiên cứu

2.1.3.1. Thí nghiệm



Hình 2.3. Minh họa thiết lập thí nghiệm theo dõi quá trình khuếch đại DNA virus HBV thời gian thực

Các phép đo được lặp lại ít nhất hai lần để xác nhận độ lặp lại. Kết quả phát hiện định lượng thu được, sau đó được xác nhận bằng điện di trên gel agarose và thử nghiệm huỳnh quang.

2.1.3.2. Điện di trên gel

5 μ l sản phẩm khuếch đại LAMP được nhuộm bằng (NEB, SUA) và dung dịch đệm 19 Tris–borate–ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) (pH 8,0). Gel agarose 2% đã được nhuộm màu với Safe-T-Stain, và sau khi gel được chạy, hình ảnh được chụp để tham khảo.

2.1.3.3. Phát hiện huỳnh quang

1 μ l thuốc thử phát hiện huỳnh quang Looamp đã được thêm vào sản phẩm LAMP 25 μ l. Hỗn hợp này sau đó được quan sát dưới ánh sáng cực tím (UV) ở bước sóng 260 nm.

2.1.3.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

(1). Phép đo vol-ampe xung vuông (SWV) được chọn để theo dõi dòng oxy hóa khử MB trong các phản ứng LAMP do thời gian đo nhanh (dưới 4 giây). Phép đo điện áp sóng vuông có biên độ xung 1 mV, tần số 12.5 Hz, độ rộng xung là 5 mV, sử dụng thiết bị Autolab (PGSTAT N 32, Metrohm, Hà Lan). (2). Thiết kế môi sử dụng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Primer Explorer v.5, Primer Blast, Mega 7 để tìm các vùng bảo tồn trên các vùng gene mục tiêu, thiết kế rồi kiểm tra các đặc tính của các oligonucleotide đã thiết kế. (3). Xử lý mẫu và tách chiết ADN: sử dụng phối hợp các phương pháp như nghiền cơ học, nhiệt, enzyme phân hủy và thu

nhận ADN theo phương pháp tách từ hoặc cột. (4). Phương pháp điện di trên gel agarose 2% trong 30 phút cường độ dòng điện 100 mA.

2.2. Mục tiêu 2: Nghiên cứu chế tạo cảm biến điện hóa rGO-PANi để phát hiện sản phẩm khuếch đại DNA bằng phương pháp đo thế mạch hở

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gần đây, độ giảm pH do các proton pyrophosphated giải phóng trong phản ứng LAMP cũng đã được sử dụng như một chỉ số để phân tích điện hóa các sản phẩm sau khuếch đại. Sau quá trình tìm hiểu và nghiên cứu, trong nội dung tiếp theo này của luận án tôi sẽ mô tả việc sử dụng PANi nhạy với pH và màng rGO có dẫn điện cao để chế tạo thiết bị theo dõi sự thay đổi pH trong quá trình khuếch đại gen trong suốt quá trình phản ứng LAMP.

2.2.2. Vật liệu phương pháp

2.2.2.1. Hóa chất thí nghiệm

Graphene oxit (GO) được điều chế từ bột than chì, Anilin ($C_6H_5NH_2$), Dung dịch đệm (PBS, pH 7,4) được sử dụng làm chất điện phân, Điện cực carbon in lưới (SPE), Thuốc thử khuếch đại LAMP (Bộ phụ kiện khuếch đại DNA Loopamp), bộ 6 primers được đặt thiết kế phù hợp với kit LAMP.

2.2.2.2. Chuẩn bị màng rGO / PANi

Cảm biến nhạy cảm với pH dựa trên rGO-PANi được chuẩn bị trên điện cực SPE. Đầu tiên, graphene oxit (1 mg ml^{-1}) được nhỏ vào điện cực. Tiếp theo, màng được khử điện hóa bằng phương pháp quét thế tuần hoàn với điện thế nằm trong khoảng từ 0 V đến 1,2 V trong một vài chu kỳ. Cuối cùng, polyaniline được mạ bằng cách quét điện cực SPE||rGO trong dung dịch H_2SO_4 0,5 M chứa anilin 0,3 M trong 10 chu kỳ từ 200 mV đến +900 mV. Hình thái bề mặt của các điện cực được đặc trưng bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường Hitachi S-4800 (FE-SEM) ở điện áp gia tốc 5 kV. Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier đo bởi kỹ thuật phản xạ toàn phần suy giảm (ATR-FTIR) của các mẫu được kiểm tra bằng IR-

Tracer 100 (Shimadzu, Nhật Bản) và các mẫu được quét trong khoảng từ 500 đến 4000 cm^{-1} . Độ kết tinh của các mẫu chuẩn bị được xác định bằng quang phổ Raman trong dải phổ 300–3500 cm^{-1} sử dụng nguồn kích thích 532 nm trên máy quang phổ Horiba.

2.2.2.3. Kiểm tra độ pH

Các phép đo hiệu chuẩn pH được thực hiện bằng cách sử dụng bộ đệm PBS với độ pH được điều chỉnh từ 6,0–9,0. Các bộ đệm này được sử dụng để đo sự thay đổi điện áp mạch hở (OCP) của điện cực làm việc so với điện cực so sánh Ag / AgCl do sự thay đổi pH. Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành ở nhiệt độ phòng. Tất cả các phép đo được thực hiện trên Metrohm Autolab PGSTAT 302N kết nối điều khiển bởi máy tính (Metrohm Co., Ltd., Thụy Sĩ).

2.2.2.4. Phản ứng LAMP

Hỗn hợp LAMP đã được chuẩn bị như đã mô tả trong công trình trước đây của chúng tôi. DNA phage được pha loãng với dung dịch đệm PBS (pH 7.4) đến nồng độ 10 ng μl^{-1} .

Hỗn hợp phản ứng (25 μl) bao gồm 1,6 μM mỗi FIP và BIP, 0,8 mM cho primer bên ngoài (primer F3 và primer B3), 0,8 mM primer vòng (primer LPF và primer LPB), hỗn hợp phản ứng (12,5 ml), Bst DNA polymerase (1 μl), và mẫu 5 μl . Phản ứng LAMP được thực hiện ở 65 °C và sau đó dừng lại ở 84 °C trong vài khoảng thời gian (0, 10, 20, 30, 40, 60 phút). Số lượng amplicon khuếch đại được ghi lại bằng cách sử dụng các phép đo OCP trong đó không có dòng điện nào xuất hiện trong pin điện hóa. Các sản phẩm LAMP cũng được phân tích định tính bằng kỹ thuật điện di trên gel trong gel agarose 2%. Nồng độ chính xác của DNA ở mọi bước phản ứng được xác định bằng cách sử dụng Nanodrop để tinh sạch dung dịch DNA.

2.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

1. Khử điện hóa bằng phương pháp quét thế tuần hoàn với điện thế nằm trong khoảng từ 0 V đến 1,2 V.

2. Polyaniline được mạ lên bề mặt trên bằng cách quét điện cực SPE||rGO trong dung dịch H₂SO₄ 0,5 M chứa anilin 0,3 M trong 10 chu kỳ từ 200 mV đến +900 mV.

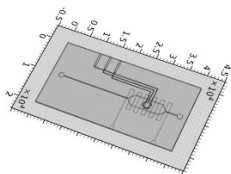
3. Sử dụng kính hiển vi điện tử quét, máy quang phổ Raman và phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier kiểm tra hình thái của điện cực.

4. Phản hồi với pH của màng rGO / PANi được kiểm tra bằng cách đo điện thế OCP ở các giá trị pH khác nhau (6.0 - 9.0)

2.3. Mục tiêu 3: Thiết kế, chế tạo hệ vi lưu tích hợp dùng cho phản ứng LAMP và phát hiện điện hóa pha lỏng

2.3.1. Đối tượng nghiên cứu

Trong chương này, tôi liệt kê chi tiết yêu cầu đặt ra và các đặc tính của thiết bị để ứng dụng cho xét nghiệm tại chỗ. Từ đó, đưa ra thiết kế của thiết bị vi lưu phù hợp với yêu cầu trên. Thiết bị sẽ gồm 3 phần, kênh vi lưu, cảm biến điện hóa và một đế nhiệt.



Hình 2.6. Thiết kế thiết bị vi lưu tích hợp.

2.3.2. Vật liệu phương pháp

Thiết bị được thiết kế để có thể giữ một lượng nhỏ mẫu và hỗn hợp kit LAMP trong buồng phản ứng kín trong suốt quá trình gia nhiệt. Trên đế kính bao gồm một lớp đế gia nhiệt và một điện cực ngăn cách nhau bởi lớp màng cách điện mỏng. Đế gia nhiệt được thiết kế để cung cấp đủ nhiệt cho buồng phản ứng và đảm bảo phân bố nhiệt đều khắp buồng. Lớp cách điện được phủ lên đế kính và phần nhiệt điện trở bằng phương pháp quay phủ với vật liệu được sử dụng là polysilazane.

Quá trình thiết kế và chế tạo kênh vi lưu trên vật liệu PDMS bằng phương pháp quang khắc photolithography gồm các bước như sau: (i) Thiết

kế mặt nạ quang (ii) Chế tạo khuôn trên đế silicon; (iii) Chế tạo hệ vi kênh trên PDMS bằng kỹ thuật replica molding (đúc khuôn).

2.3.3. Nội dung nghiên cứu

2.3.3.1. Thiết kế mặt nạ quang

Phần mềm AutoCAD 2007 được sử dụng để thiết kế các chi tiết cũng như hình dáng của hệ vi kênh. Sau đó bản thiết kế được chuyển đến hệ máy tính liên kết với hệ máy in. Các thiết kế này được in trên vật liệu có độ truyền qua cao (giấy kính PET) được chỉ ra như hình trên đây. Cuối cùng các tấm mặt nạ quang này được bảo quản sạch sẽ trước khi chuyển vào hệ quang khắc.

2.3.3.2. Chế tạo khuôn cho hệ kênh vi lưu

Quy trình chế tạo master được thực hiện theo các bước dưới đây và toàn bộ quá trình chế tạo này được thực hiện trong phòng sạch (phòng sạch thuộc Takamura Laboratory, Material Science School, JAIST): Bước 1: Làm sạch silicon wafer; Bước 2: Quay phủ chất cản quang SU-8 với bề dày mong muốn; Bước 3: Gia nhiệt; Bước 4: Quang khắc; Bước 5: Gia nhiệt sau quang khắc; Bước 6: Tráng rửa bằng dung dịch tương ứng với SU-8; Bước 7: Rửa và sấy khô; Bước 8: Gia nhiệt hoàn thiện khuôn.

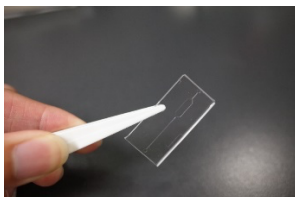


Hình 2.10. Một trong các mask chứa chi tiết kênh dương (nổi) được chế tạo bằng phương pháp quang khắc.

2.3.3.3. Chế tạo vi kênh trên vật liệu PDMS

Chuẩn bị hỗn hợp PDMS: PDMS và chất làm rắn sylgard 184 được trộn theo tỷ lệ = 10:1, hỗn hợp này được trộn đều, sau đó sử dụng bơm chân không hút hết bọt khí ra khỏi hỗn hợp; Khuôn được đặt trong một khay hình tròn; Đổ hỗn hợp PDMS trên vào khuôn; Đưa khay vào trong tủ sấy và gia

nhệt ở nhiệt độ 120 °C trong 2 giờ, sau đó bóc ra khỏi khuôn; Thu được PDMS với các chi tiết vi kênh như đã thiết kế; rửa sạch với iso-propanol (hoặc ethanol) và nước khử ion, sau đó được làm khô bằng súng nitrogen. Cả PDMS và lam kính được đưa vào thiết bị xử lý và làm sạch plasma SAMCO Model FA-1. Kết thúc chương trình plasma, PDMS và lam kính được đưa ra ngoài và gắn vào nhau.



Hình 2.11. Một trong các hệ vi lưu được chế tạo trên vật liệu PDMS.

2.3.3.4. Chế tạo khuôn cho điện cực và đế gia nhiệt

Theo đúng quy trình như đã trình bày ở trên.

2.3.3.5. Chế tạo điện cực vàng và đế gia nhiệt platin

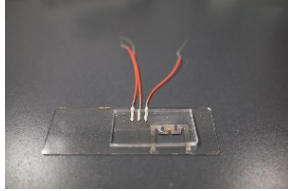
+ Tạo đế gia nhiệt: Lớp phủ titan được thực hiện trước, sau đó tiến hành bốc bay phủ lớp platin lên bề mặt đế. Thông số cài đặt hệ bốc bay như sau: Plasma: RF=120W, 31 sccm Ar; Ti layer: RF=75W, 5.2 sccm Ar, 8 phút; Pt layer: RF=100W, 4.8 sccm Ar, 10 phút; + Tạo điện cực vàng:

+ Tạo điện cực vàng: Lớp phủ titan được thực hiện trước, sau đó tiến hành bốc bay phủ lớp vàng lên bề mặt đế. Độ dày lớp phủ lần lượt là Au 50nm, Ti 5nm. Thông số cài đặt hệ bốc bay như sau: Ti layer: 0.02nm/s, 11.3A, 40mA, 5 phút; Au layer: 0.06nm/s, 12A, 80mA, 15 phút.



Hình 2.18. Kiểm tra khả năng hoạt động của đế nhiệt với hệ 4 đầu dò.

Để nhiệt được cấp dòng điện xác định bằng một máy phát, sau đó được đo nhiệt độ tại một số vị trí bất kỳ trên đế.



Hình 2.19. Thiết bị vi lưu tích hợp điện cực và đế gia nhiệt sau khi lắp ráp hoàn thiện.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chế tạo cảm biến điện hóa trên hệ vi lưu sử dụng methylene blue là đầu dò oxy hóa khử để phát hiện virus HBV

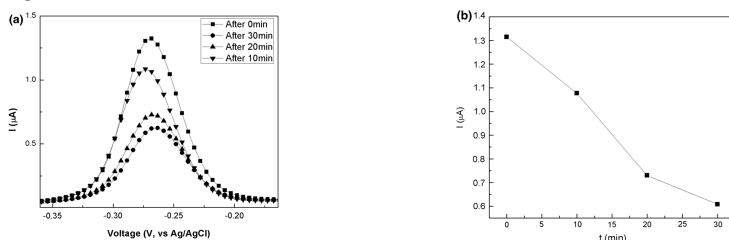
3.1.1. Kết quả và thảo luận

3.1.1.1. Tính ổn định điện hóa của đầu dò oxy hóa khử

Dung dịch MB 20 μ M được gia nhiệt ở nhiệt độ 60-65 $^{\circ}$ C. Sau 30 phút, không có sự thay đổi về tín hiệu đầu ra, tín hiệu duy trì ở khoảng 1,1 μ A (\pm 5%), xác nhận rằng có thể tiến hành các thí nghiệm tiếp theo về định lượng HBV trong thời gian thực bằng cách sử dụng tương tác của nó với xanh methylen.

3.1.2. Phát hiện HBV thời gian thực

Dữ liệu về dòng oxy hóa khử theo thời gian thực cho thấy sự giảm rõ ràng trong 30 phút của phản ứng (Hình 2.5). Khi bắt đầu phản ứng thu được dòng oxy hóa khử tương đối cao (1,3 μ A) do các phân tử MB tự do trong dung dịch tạo ra.



Hình 3.2. Phát hiện HBV thời gian thực trên hệ LAMP-EC-MF.

Khi kết thúc phản ứng, liên kết MB với amplicon dsDNA sinh ra bởi phản ứng khuếch đại LAMP làm giảm đáng kể nồng độ MB tự do trong dung dịch mẫu, do đó làm giảm dòng điện cực đại (0,6 μ A).

3.1.3. So sánh với điện di trên gel và huỳnh quang

Hình ảnh điện di trên gel (Hình 2.6) cho thấy nhiều dải có kích thước khác nhau cho mẫu dương tính, tín hiệu sáng (Hình 2.7) cũng thu được tương ứng với mẫu dương tính theo kết quả sử dụng thiết bị.

3.1.4. Kết luận

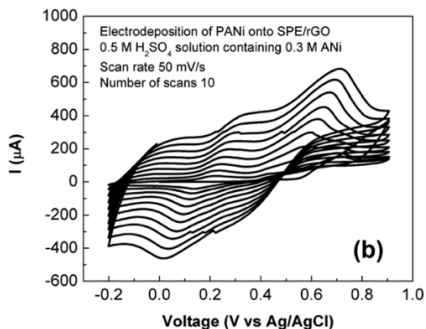
Thiết bị tích hợp LAMP – điện hóa – vi lưu cho phép phát hiện mầm bệnh từ lượng mẫu rất nhỏ trong dưới 70 phút, nhanh hơn rõ rệt so với PCR truyền thống nhưng vẫn giữ độ nhạy và đặc hiệu cao. Thiết kế vi lưu đơn giản, nhiệt độ phản ứng thấp và đo điện hóa trực tiếp trên chip giúp hệ thống phù hợp phát triển thành thiết bị cầm tay tầm soát HBV và các mầm bệnh khác tại chỗ, đặc biệt hữu ích ở nơi thiếu nguồn lực.

3.2. Nghiên cứu chế tạo cảm biến điện hóa rGO-PANi để phát hiện sản phẩm khuếch đại DNA bằng phương pháp đo thế mạch hở

3.2.1. Kết quả và thảo luận

3.2.1.1. Chuẩn bị màng rGO-PANi

Màng rGO-PANi được điều chế bằng cách điện phân anilin (0,3 M) trong dung dịch H_2SO_4 0,5 M trên bề mặt của SPE biến tính với rGO. Như được thấy từ Hình 3.1 cho thấy sự khử của vật liệu graphene oxit được drop-casting, một đỉnh khử mạnh xuất hiện ở khoảng - 1000 mV với thế onset là -900 mV trong chu kỳ đầu tiên khi quét thế tuần hoàn của graphen oxit. Trong các chu kỳ tiếp theo, cường độ của đỉnh khử giảm đột ngột (Hình 3.2). Trong khi đó, không có đỉnh anot cho tất cả các chu kỳ. Điều này chứng tỏ sự chuyển đổi không thể đảo ngược trong đó graphene oxit được chuyển hoàn toàn thành dạng khử của nó. Các đường biểu diễn quét thế tuần hoàn được ghi lại trong quá trình mạ của PANi trên màng rGO được thể hiện trong Hình 3.7.

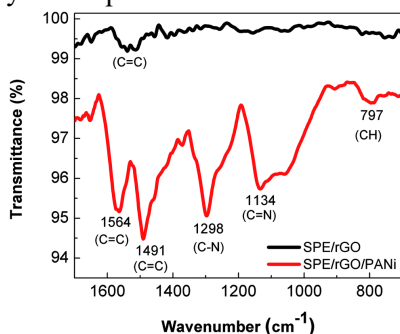


Hình 3.7. Sự lắng đọng điện của polyaniline lên SPE / rGO

Sự gia tăng liên tục của mật độ dòng điện đã chỉ ra sự phát triển của PANi trên bề mặt rGO. Sự chuyển đổi giữa các trạng thái oxy hóa khác nhau của polyaniline cũng được quan sát thấy trong quá trình lắng đọng. Như đã thấy trên các đường biểu diễn quét thế tuần hoàn trong Hình 3.3, sóng anốt đầu tiên nằm ở +225 mV (so với Ag / AgCl) cho thấy sự chuyển đổi dạng leucoemeraldine của polyaniline thành muối emeraldine trong khi sóng anốt thứ hai xảy ra ở +565 mV (so với Ag / AgCl) biểu thị sự hình thành của muối perningranilin được pha tạp hoàn toàn. Quá trình quét cuối cùng được dừng lại ở 0 V để thu được emeraldine - dạng dẫn điện duy nhất của polyanilin.

3.2.1.2. Cấu trúc và hình thái của màng rGO-PANi

Phổ ATR-FTIR của rGO ghi lại sự hiện diện của C=C kéo dài ($1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), sự biến mất của $\text{C}=\text{O}$ (1700 cm^{-1}) và $\text{C}-\text{O}-$ (1010 cm^{-1}) kéo dài của nhóm cacboxylic và epoxit.



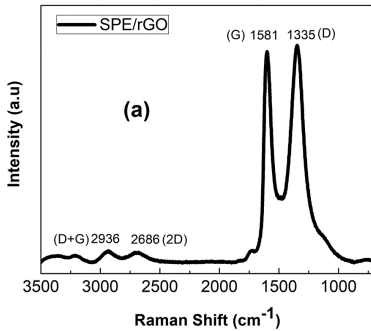
Hình 3.10. Phổ ATR-FTIR của màng rGO (đen) và rGO-PANi (đỏ)

Kết quả này chỉ ra rằng hầu hết các nhóm chứa oxy trên vật liệu graphene oxit drop-casting đã bị loại bỏ. Đồng thời, các dải đặc trưng của cấu trúc emeraldine thu được rõ ràng trên quá trình mạ điện màng rGO / PANi: 1564 và 1491 cm^{-1} (C=C stretch) 1298 cm^{-1} (C-N stretch), 1134 cm^{-1} (C=N), 797 cm^{-1} (C-H).

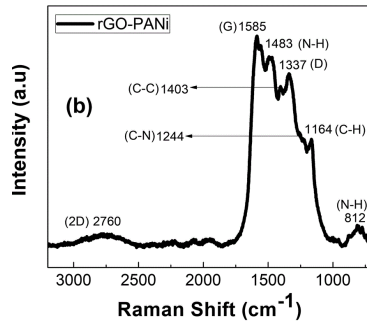
Hình 3.10 thể hiện phổ Raman của phim rGO và rGO-PANi. Các đỉnh ở 1335 cm^{-1} , 1581 cm^{-1} , 2686 cm^{-1} được gán cho các dải Raman D, G và 2D điển hình của vật liệu graphite, tương ứng. Dải D liên quan đến các

khuyết tật, các cạnh và rối loạn cấu trúc của cacbon rắn trong khi dải G được liên kết với sự tán xạ bậc nhất của mode E_{2g} cacbon lai hóa sp^2 . Tỷ lệ cường độ ID / IG là một chỉ báo hiệu quả về sự chuyển đổi giữa GO và rGO. Ở đây, phổ Raman (Hình 3.11) của rGO sau khi khử điện hóa cho thấy tỷ lệ ID / IG là 0,946, cao hơn đáng kể so với giá trị đó của GO là 0,803.

Điều này chỉ ra rằng có sự gia tăng số lượng các vị trí khuyết tật do việc loại bỏ các nhóm chức năng khỏi GO và vật liệu GO bị khử điện hóa thành rGO. Khi có polyaniline được lắng đọng điện trên rGO, vị trí của các đỉnh ở trên (Hình 3.11) hơi bị dịch chuyển sang các số sóng dài hơn là 1337 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} và 2760 cm^{-1} . Các đỉnh Raman khác nằm ở 812 , 1164 , 1244 , 1403 , 1483 cm^{-1} phù hợp lần lượt với sự biến dạng của amin (benzoid), uốn trong mặt phẳng C – H (benzoid), C – N = kéo dài amin mở đầu (quinoid), C – C kéo dài (quinoid), và uốn cong N – H (quinoid), tương ứng (Hình 3.11).



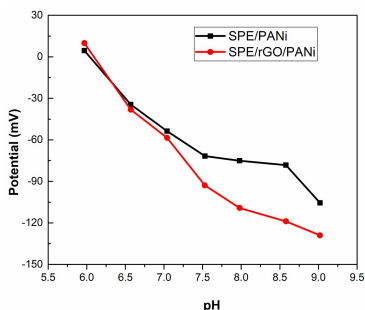
Hình 3.11. Phổ Raman của màng rGO



Hình 3.12. Phổ Raman của màng rGO-PANi

3.2.1.3. Kiểm tra độ pH

Tùy thuộc vào quá trình chế tạo điện cực, độ dốc của đường chuẩn nằm trong khoảng từ 55 đến 90 mV trên một đơn vị pH. So với màng polyaniline nguyên sinh (Hình 3.8), composite rGO-PANi có độ dốc lớn hơn của đường cong phản ứng OCP-pH, có thể là do độ dẫn điện cao của vật liệu rGO.

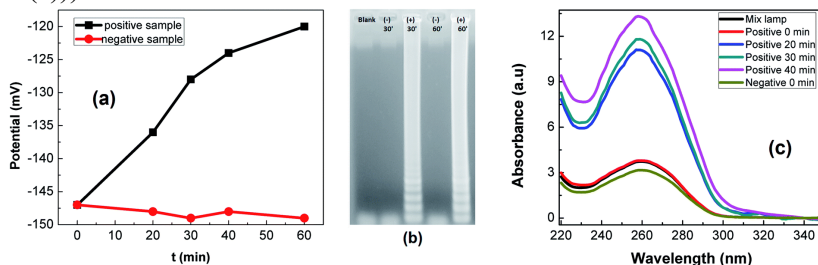


Hình 3.14. Đường chuẩn pH của SPE / PANi (đen) và SPE / rGO-PANi.

3.2.1.4. Phản ứng LAMP

Cơ chế phát hiện dựa trên sự giảm pH do các ion hydronium giải phóng trong quá trình kéo dài DNA trong phản ứng LAMP. Hình 3.10 (a) cho thấy sự biến đổi chuẩn hóa của điện thế đo được liên quan đến phản ứng LAMP trong trường hợp mẫu dương tính và âm tính. Ta nhận thấy giá trị OCP tăng theo thời gian phản ứng (27 mV trong 40 phút), cho thấy sự gia tăng số lượng amplicon và proton được giải phóng.

Trong khi đó, sự giảm giá trị OCP có thể bỏ qua được tìm thấy đối với mẫu âm tính (Hình 6 (a)). Điều này chứng tỏ độ đặc hiệu cao của cảm biến. Các kết quả này phù hợp tốt với các phép đo điện di và độ hấp thụ trên gel. Trong Hình 3.10 (b), mẫu LAMP dương tính cho thấy nhiều dải có kích thước khác nhau khi điện di trên gel agarose. Đồng thời, nồng độ DNA được tìm thấy đã tăng lên khoảng 103 lần (như được xác định từ phổ hấp thụ (Hình 3.10 (c))).



Hình 3.15, 3.16, 3.17. Phản ứng LAMP: phát hiện OCP (a), điện di trên gel (b) và đo độ hấp thụ (c) của các sản phẩm LAMP.

3.2.2. Kết luận

Độ nhạy pH của rGO-PANi đã được NCS nghiên cứu và ứng dụng thành công để phát hiện phản ứng LAMP bằng phương pháp đo OCP; Lớp hấp phụ rGO với độ dẫn điện cao và độ nhạy pH nội tại đã góp phần vào độ nhạy nâng cao tổng thể của bề mặt cảm biến: Giá trị OCP giảm 27 mV được tìm thấy khi khuếch đại gen 102 lần.

3.3. Thiết kế, chế tạo hệ vi lưu tích hợp dùng cho phản ứng LAMP và phát hiện điện hóa pha lỏng

Phần này cho thấy hệ đế nhiệt platin trên chip vi lưu hoạt động ổn định và có thể hiệu chuẩn chính xác. Nhiệt độ đo được trên đế tăng gần tuyến tính khi tăng điện thế cấp, với hệ số tương quan $r = 0,979$ và $R^2 \approx 0,958$, nghĩa là khoảng 96% biến thiên nhiệt độ được xác định bởi điện thế đặt. Phương trình hồi quy $T = 12,26 + 3,137 \cdot V$ cho phép suy ra nhiệt độ từ điện thế với sai số nhỏ, rất hữu ích khi vận hành chip mà không gắn cảm biến nhiệt riêng cho từng buồng phản ứng.

Từ đó có thể kết luận thiết kế – lựa chọn vật liệu và cách tích hợp đế nhiệt trên hệ vi lưu là phù hợp, đáp ứng yêu cầu kiểm soát nhiệt chính xác cho phản ứng LAMP đồng thời giảm tài nguyên và số lượng linh kiện cần thiết trong thí nghiệm.

KẾT LUẬN

Luận án: “*Nghiên cứu chế tạo, đặc trưng hệ vi lưu tích hợp. Định hướng ứng dụng cho phân tích và tổng hợp vật liệu*” đã được tác giả thực hiện và đạt được những kết quả chính sau:

(1) Đã xây dựng thành công hệ thí nghiệm theo dõi quá trình khuếch đại DNA của virus HBV bằng phản ứng LAMP trên biochip. Toàn bộ quy trình – từ khuếch đại đến phân tích tín hiệu điện hoá – được thực hiện trong thời gian dưới 70 phút. (2) Đã chế tạo thành công cảm biến điện hoá dựa trên màng rGO-PANi để phát hiện sản phẩm khuếch đại DNA bằng phép đo thế mạch hở (OCP). Lớp rGO có độ dẫn cao kết hợp với độ nhạy pH nội tại của PANi giúp tăng đáng kể độ nhạy tổng thể của bề mặt cảm biến; giá trị OCP giảm khoảng 27 mV khi số bản sao gen tăng 102 lần. (3) Đã đề xuất và bước đầu hoàn thiện một hệ vi lưu tích hợp vừa thực hiện khuếch đại đẳng nhiệt LAMP vừa phát hiện điện hoá trên cùng nền chip. Đế nhiệt tích hợp được kiểm tra hoạt động ổn định, có thể đạt và duy trì dải nhiệt độ 60–65 °C cần thiết cho phản ứng LAMP khi cấp nguồn khoảng 15–17 V.

KIẾN NGHỊ

1. Thử nghiệm khả năng phát hiện chỉ dấu sinh học một số bệnh, tác nhân gây bệnh của thiết bị tích hợp đã chế tạo với các mẫu bệnh phẩm để xác định độ nhạy, độ đặc hiệu thực tế;

2. Thử nghiệm trên các cấu trúc đa kênh cho phép phát hiện đồng thời nhiều chỉ dấu sinh học trong cùng một phép đo và đánh giá đáp ứng tính hiệu và độ ổn định của thiết bị;

3. Phát triển nghiên cứu kết hợp phương pháp in 3D và điện cực mực in nhằm đơn giản hóa khâu chế tạo, tối ưu hóa cấu hình và khả năng tự động hóa trong các bước chuẩn bị mẫu, cũng như thu thập và xử lý số liệu tiến đến mô hình thu nhỏ phòng thí nghiệm trên chip (lab on chip) hiện nay.

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Van Anh, N., Van Trung, H., Tien, B.Q. et al, Development of a PMMA Electrochemical Microfluidic Device for Carcinoembryonic Antigen Detection -. Journal of Elec Materi, 2016, 45: 2455.
2. Thu, V.T., Mai, A.N., Le The Tam et al., Fabrication of PDMS-Based Microfluidic Devices: Application for Synthesis of Magnetic Nanoparticles, Journal of Elec Materi, 2016, 45: 2576.
3. Tien, B.Q., Ngoc, N.T., Loc, N.T. et al., Biochip for Real-Time Monitoring of Hepatitis B Virus (HBV) by Combined Loop-Mediated Isothermal Amplification and Solution-Phase Electrochemical Detection, Journal of Elec Materi, 2017.
4. Thu, V.T., Tien, B.Q., Lam, T.D.,Nga, D.T.N. et al., Reduced graphene oxide-polyaniline film as enhanced sensing interface for the detection of loop-mediated-isothermal-amplification products by open circuit potential measurement, RSC Adv., 2018, 8, 25361-25367.