

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 Tiên

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

LUẬN ÁN TIẾN SỸ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội – 2025

**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**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Vật liệu điện tử

Mã số: 9440123

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS.TS Trần Đại Lâm
2. PGS.TS Phan Huy Hoàng

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan 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*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 20

Tác giả luận án

NCS. Bùi Quang Tiến

LỜI CẢM ƠN

Với tấm lòng kính trọng, tôi xin bày tỏ sự biết ơn đối với GS.TS. Trần Đại Lâm và PGS.TS. Phan Huy Hoàng bởi những chỉ dẫn quý báu về phương pháp luận và định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn tôi, động viên, khích lệ và hết lòng giúp đỡ để luận án được hoàn thành.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn đối với Ban Lãnh đạo, toàn thể cán bộ Viện Khoa học Vật liệu, Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, các cán bộ nghiên cứu tại Phòng thí nghiệm Khoa học Vật liệu và Công nghệ Nano, Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Ban Giám hiệu Trường Đại học Kỹ thuật – Hậu cần Công an nhân dân, lãnh đạo Khoa Khoa học cơ bản và Ngoại ngữ, các giáo viên đồng nghiệp trong Khoa đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất và thời gian, hỗ trợ về chuyên môn cũng như ngoài chuyên môn để tác giả hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin được dành những lời cảm ơn sâu nặng đến gia đình tôi: bố, mẹ, vợ, con đã yêu thương, người thân và bạn bè đã cảm thông và chia sẻ, động viên, hỗ trợ mọi điều kiện để tôi có thể tập trung học tập và nghiên cứu trong suốt những năm tháng học tập tại Học viện Khoa học và Công nghệ.

Hà Nội, ngày tháng năm 20

Tác giả luận án

NCS. Bùi Quang Tiến

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU.....	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	v
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	6
1.1. Chip sinh học và hệ thống vi cơ lỏng (Biochip and Microfluidics).....	6
1.2. Cảm biến sinh học điện hóa	10
1.2.1. Phân loại cảm biến sinh học	10
1.2.2. Phân tích điện hóa.....	12
1.2.3. Kỹ thuật đo trong cảm biến điện hóa.....	14
1.2.4. Cảm biến điện hóa trên nền thiết bị vi lưu.....	20
1.2.5. Tình hình nghiên cứu cảm biến điện hóa tích hợp hệ vi lưu trong nước.....	21
1.3. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP	23
1.3.1. Nguyên lý của kỹ thuật LAMP	25
1.3.2. Thành phần cơ bản của phản ứng LAMP	26
1.3.3. Cơ chế phản ứng LAMP	26
1.3.4. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật LAMP.....	29
1.3.5. Tích hợp kỹ thuật LAMP trên thiết bị vi lưu	29
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
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.....	35
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	35
2.1.2. Vật liệu và phương pháp.....	38
2.1.3. Nội dung nghiên cứu.....	39
2.1.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	45
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	45
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu	45
2.2.2. Vật liệu và phương pháp.....	47
2.2.3. Nội dung nghiên cứu.....	47
2.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	48
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.....	49
2.3.1. Đối tượng nghiên cứu	49

2.3.2. Vật liệu phương pháp.....	50
2.3.3. Nội dung nghiên cứu.....	51
2.3.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	67
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	71
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	71
3.1.1. Kết quả và thảo luận	71
3.1.2. Phát hiện HBV thời gian thực.....	73
3.1.3. So sánh với điện di trên gel và huỳnh quang	77
3.1.4. Kết luận.....	79
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	80
3.2.1. Kết quả và thảo luận	80
3.2.2. Kết luận.....	97
3.3. Thiết kế, chế tạo hệ vi lưu tích hợp dùng cho phản ứng LAMP và phát hiện điện hóa pha lỏng	97
3.4. Kết luận	98
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	100

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

TT	Viết tắt	Từ tiếng Anh đầy đủ	Nghĩa tiếng Việt
1	Ab	Antibody	Kháng thể
2	Ag	Antigen	Kháng nguyên
3	AO	Atomic Orbital	Orbitan nguyên tử
4	APTES	3-aminopropyl–triethoxy silane	3-aminopropyl–triethoxy-silan
5	BSA	Bovine serum albumin	Albumin huyết thanh bò
6	CE	Counter Electrode	Điện cực đối
7	CV	Cyclic Voltammetry	Phương pháp Von-Ampe vòng
8	DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
9	DPV	Diffirential Pulse Voltammetry	Vi sai xung Voltammetry
10	EID50	50 % Empryo infective dose	Liều nhiễm trùng trên phôi (gà)
11	EIS	Electrochemical impedance spectroscopy	Phổ tổng trở điện hóa
12	ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay	Kỹ thuật miễn dịch hấp phụ gắn men
13	FE-SEM	Field Emision Scanning Electron Microscope	Hiển vi điện tử quét phát xạ trường
14	FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
15	GA	Glutaraldehyde	Glutaraldehyde
16	GS	Galvanostatic	Phương pháp dòng không đổi

17	HIV	Human immunodeficiency virus	Virus gây suy giảm miễn dịch cho người
18	HPV	Human papillomavirus	Virus gây ung thư cổ tử cung
19	ISFET	Ion sensitive field effect transistor	Transistor hiệu ứng trường nhạy ion
20	ITO	Indium tin oxide	Oxit thiếc - Indi
21	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Hiệp hội Hóa Tinh khiết và Ứng dụng Quốc tế
22	MO	Molecular Orbital	Orbitan phân tử
23	MPTMS	(3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane	(3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane
24	NHS	N-Hydroxysuccinimide	N-Hydroxysuccinimide
25	PANi	Polyaniline	Polyaniline
26	PBS	Phosphate buffered saline	Dung dịch đệm phosphate
27	PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
28	PDMS	Polydimethylsiloxane	Polydimethylsiloxane
29	PPy	Polypyrrole	Polypyrrole
30	PrA	Protein A	Protein A
31	PRE	Pseudo reference electrode	Điện cực so sánh thay thế
32	RE	Reference electrode	Điện cực so sánh
33	SARS	Severe acute respiratory syndrome	Hội chứng hô hấp cấp tính nặng
34	SEM	Scanning electron microscopy	Hiển vi điện tử quét

35	SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy	Phổ Raman Tăng cường bề mặt
36	SWV	Square Wave Voltammetry	Von-ampe sóng vuông
37	UV	Ultraviolet	Tử ngoại
38	WE	Working Electrode	Điện cực làm việc
39	WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Đặc điểm của một số thiết bị vi lỏng dựa trên khuếch đại axit nucleic.....	32
Bảng 2.1. Danh sách trình tự các primer thiết kế cho LAMP.....	38

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Đồ thị quét thế vòng tuần hoàn CV thời điểm, điện thế quét (A), biểu diễn dòng điện tương ứng (B).....	16
Hình 1.2. Quan hệ giữa điện thế và dòng điện trong quét thế tuần hoàn.....	17
Hình 1.3. Biên độ thế của chu kỳ xung (A), đặc trưng đường cong Vôn-ampe (B) trong phương pháp đo DPV.....	19
Hình 1.4: Công nghệ vi lưu trong phát hiện mầm bệnh.....	23
Hình 1.5. Các vị trí thiết kế môi LAMP.....	26
Hình 1.6. Sơ đồ phản ứng tạo vật liệu khởi đầu.....	27
Hình 1.7. Tái bản và kéo dài chuỗi ADN.....	27
Hình 1.8. Các bước tiến hành kỹ thuật LAMP.....	28
Hình 1.9. Ví dụ về các thiết bị vi lỏng được sử dụng khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt để phát hiện mầm bệnh.....	31
Hình 2.1. Tình hình nhiễm virus HBV trên thế giới.....	36
Hình 2.2. Thiết kế ý tưởng của slip-chip LAMP-EC-MF.....	39
Hình 2.3. Minh họa thiết lập thí nghiệm theo dõi quá trình khuếch đại DNA virus HBV thời gian thực.....	40
Hình 2.4. Đổ gel agarose vào bể chứa.....	43
Hình 2.5. Nạp mẫu vào các giếng.....	44
Hình 2.6. Thiết kế và kích thước thiết bị vi lưu tích hợp.....	50
Hình 2.7. Mặt nạ chứa các chi tiết thiết kế kênh dương.....	51
Hình 2.8. Thiết bị quay phủ (MIKASA – 1HDX2).....	53
Hình 2.9. Hệ thiết bị quang khắc tích hợp.....	54

Hình 2.10. Một trong các mặt nạ chứa chi tiết kênh dương (nội) được chế tạo bằng phương pháp quang khắc.....	55
Hình 2.11. Một trong các hệ vi lưu được chế tạo trên vật liệu PDMS.....	57
Hình 2.12. Hệ bốc bay để tạo lớp Au.....	62
Hình 2.13. Hệ bốc bay ULVAC dùng để tạo lớp Pt.....	63
Hình 2.14. Điện cực vàng sau khi chế tạo.....	63
Hình 2.15. Ảnh chụp điện cực vàng từ kính hiển vi điện tử.....	64
Hình 2.16. Đế nhiệt Pt sau khi chế tạo.....	64
Hình 2.17. Ảnh chụp đế nhiệt platin từ kính hiển vi điện tử.....	65
Hình 2.18. Kiểm tra khả năng hoạt động của đế nhiệt với hệ 4 đầu dò.....	65
Hình 2.19. Thiết bị vi lưu tích hợp điện cực và đế gia nhiệt sau khi lắp ráp hoàn thiện.....	67
Hình 3.1. Độ bền nhiệt của hoạt tính oxi hóa khử xanh metylen.....	72
Hình 3.2. Phát hiện HBV thời gian thực trên hệ LAMP-EC-MF.....	76
Hình 3.3. Điện di trên gel của sản phẩm LAMP sau khi kết thúc phản ứng khuếch đại.....	78
Hình 3.4. Phát hiện huỳnh quang của sản phẩm LAMP sau khi kết thúc phản ứng khuếch đại.....	79
Hình 3.5. Khử điện của SPE phủ graphene oxit.....	80
Hình 3.6. Màng graphene oxit được khử điện hóa bằng cách quét trong dung dịch PBS (pH 7,4) ở tốc độ quét 50 mV / s trong nhiều lần quét.....	81
Hình 3.7. Sự lắng đọng điện của polyaniline lên SPE / rGO.....	82
Hình 3.8. Các trạng thái có sẵn của polyaniline.....	82

Hình 3.9. Hình ảnh SEM của màng rGO (a) và rGO-PANi (b).....	84
Hình 3.10. Phổ ATR-FTIR của màng rGO (đen) và rGO-PANi (đỏ).....	86
Hình 3.11. Phổ Raman của màng rGO.....	87
Hình 3.12. Phổ Raman của màng rGO-PANi.....	88
Hình 3.13a. Đường chuẩn pH của điện cực SPE / rGO-PANi.	89
Hình 3.13b. Sơ đồ thể hiện cơ chế nhạy với pH của điện cực SPE / rGO-PANi.	90
Hình 3.14. Đường chuẩn pH của SPE / PANi (đen) và SPE / rGO-PANi.....	90
Hình 3.15. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng phương pháp điện hoá OCP	94
Hình 3.16. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng điện di trên gel.....	94
Hình 3.17. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng phổ hấp thụ.....	95
Hình 3.18. Hình ảnh sản phẩm LAMP cho mẫu âm tính (bên trái) và mẫu dương tính (bên phải).....	95
Hình 3.19. Sự phụ thuộc của điện trở và điện thế.....	97

MỞ ĐẦU

Sự bùng phát đại dịch COVID-19 từ đầu năm 2020 đã cho thấy rõ nhu cầu chuyển dịch từ mô hình y tế công cộng tập trung sang mô hình phi tập trung dựa trên nền tảng số, ứng dụng trong theo dõi, chẩn đoán và điều trị từ xa. Để hiện thực hóa mục tiêu này, việc thu nhỏ các thiết bị phân tích y sinh mà vẫn đảm bảo độ chính xác, độ nhạy và rút ngắn thời gian xét nghiệm là bước đi then chốt. Các kỹ thuật phát hiện mầm bệnh truyền thống như nuôi cấy, ELISA hay PCR thường đòi hỏi hạ tầng tiên tiến và phòng thí nghiệm được trang bị đầy đủ, kèm theo quy trình phức tạp, cần nhân lực trình độ cao, thiết bị – hóa chất đắt tiền và đôi khi bệnh nhân phải đến cơ sở y tế nhiều lần [1], làm giảm tính linh hoạt trong chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời [2].

Để khắc phục những hạn chế này, các phương pháp xét nghiệm tại điểm chăm sóc (POC/POCT) ngày càng thu hút sự quan tâm. POCT là các xét nghiệm được thực hiện gần nơi bệnh nhân được chăm sóc, cho kết quả gần như tức thời để bác sĩ ra quyết định lâm sàng. Theo bộ tiêu chí REASSURED, một xét nghiệm POC lý tưởng cần: kết nối thời gian thực, lấy mẫu dễ dàng, chi phí thấp, độ nhạy và độ đặc hiệu cao, thân thiện với người dùng, nhanh và ổn định, không phụ thuộc thiết bị phức tạp và có thể đưa đến tận tay người dùng. Nhu cầu các thiết bị POCT tăng nhanh, đặc biệt ở vùng hạn chế hạ tầng, nơi phát hiện sớm tác nhân gây bệnh có ý nghĩa quyết định cho điều trị và kiểm soát dịch [2].

Thực tế cho thấy, ngoài nhu cầu xét nghiệm nhanh tại chỗ (point-of-care testing - POCT) đối với các bệnh truyền nhiễm có khả năng lây lan cao, việc theo dõi quá trình hồi phục của bệnh nhân cũng cần có những mối quan tâm tương ứng. Nhu cầu này thúc đẩy sự phát triển ngày càng mạnh mẽ của các thiết bị POC, hướng đến phát hiện hiệu quả các chất phân tích như nucleic acid (NA) trong dịch cơ thể và các chất lỏng sinh học khác. Ưu điểm nổi bật của các thiết bị này là khả năng cung cấp kết quả chính xác, đáng tin cậy trong thời gian ngắn, đồng thời tối ưu hóa kích thước hệ thống và giảm thiểu thể tích mẫu cần dùng [1].

Trong bối cảnh đó, phương pháp phát hiện điện hóa trở thành giải pháp hấp dẫn cho thiết bị POC, đặc biệt trong chẩn đoán bệnh truyền nhiễm và chẩn đoán đồng hành, nhờ các ưu điểm vượt trội về khả năng thu nhỏ, độ bền và hiệu quả chi phí [1]. Để nâng cao hiệu năng của hệ thống, các nghiên cứu tập trung vào việc kết hợp kỹ thuật điện hóa với quy trình chức năng hóa điện cực đặc hiệu cho từng loại NA, từ đó hoàn thiện thiết bị hướng tới thương mại hóa.

Để đạt độ nhạy mong muốn trong xét nghiệm sinh học, khuếch đại RNA/DNA đích là thường được chọn là bước đầu tiên nhằm tăng nồng độ chất phân tích trong

mẫu. Trong đó, các kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt được ưu tiên tích hợp vào thiết bị POCT nhờ đáp ứng tiêu chí vận hành đơn giản và chi phí thấp. Trong số các phương pháp phổ biến, kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt vòng trung gian (LAMP) nổi bật nhờ hiệu suất thời gian, độ nhạy và độ đặc hiệu cao [3].

Việc phát hiện sớm mầm bệnh để ngăn chặn dịch bùng phát và giảm thiểu tác động đến sức khỏe đòi hỏi giải pháp chẩn đoán nhanh chóng, chính xác, tại chỗ với chi phí thấp. Yêu cầu này đặc biệt cấp thiết tại các vùng nghèo tài nguyên – nơi dịch bệnh dễ bùng phát và diễn biến nghiêm trọng – hoặc trong điều kiện khẩn cấp như vùng hoang dã, chiến trường, nơi hỗ trợ y tế bị hạn chế [4,5]. Trong những tình huống này, công nghệ vi lưu (microfluidics) – kết hợp hệ thống cơ điện vi mô, công nghệ nano và khoa học vật liệu để thao tác chính xác với vi thể tích chất lỏng [6-9] – mở ra triển vọng mới cho xét nghiệm POCT phát hiện mầm bệnh ngoài môi trường phòng thí nghiệm. Công nghệ này thiết lập quy trình chẩn đoán phân tử tiết kiệm mẫu và chi phí trong kiểm soát dịch bệnh so với phương pháp truyền thống [10,11]. Đại dịch COVID-19 do SARS-CoV-2 gây ra một lần nữa khẳng định vai trò quan trọng của vi lưu trong ứng phó kịp thời [12–14]. Khác với chẩn đoán truyền thống, hệ thống vi lưu POCT sử dụng thiết bị thu nhỏ, di động, thực hiện xét nghiệm ngay tại điểm lấy mẫu [15] với các ưu điểm: quy trình chuẩn bị mẫu đơn giản (hoặc không cần), khuếch đại tín hiệu nhanh, phát hiện nhạy, cho kết quả chính xác trong thời gian ngắn.

Thời gian gần đây, nghiên cứu phát triển thiết bị vi lưu tích hợp cảm biến điện hóa cho chăm sóc sức khỏe và y tế dự phòng ngày càng được quan tâm. Cảm biến điện hóa cho phép phát hiện tác nhân gây bệnh nhanh, nhạy, chính xác, đặc biệt phù hợp với chẩn đoán quy mô lớn. Việc ứng dụng vật liệu nano để biến tính bề mặt điện cực giúp cảm biến sinh học điện hóa có tiềm năng lớn trong phân tích đối tượng y sinh, nhờ ưu thế về tốc độ phân tích, tính cơ động, độ chọn lọc và độ nhạy cao. Hoạt động của cảm biến/cảm biến sinh học điện hóa dựa trên sự thay đổi đặc tính điện sau phản ứng sinh hóa. Sự thay đổi vi mô này được ghi nhận và phân tích bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, trong đó phương pháp điện hóa nổi bật nhờ thiết bị đơn giản, gọn nhẹ, chi phí thấp và dễ vận hành, góp phần giảm chi phí và đơn giản hóa quy trình.

Nhiều kỹ thuật điện hóa đã được phát triển để phân tích động học phản ứng trên bề mặt điện cực, mỗi kỹ thuật có ưu thế riêng. Tín hiệu điện đầu ra tỷ lệ với bản chất phản ứng, mang lại các lợi ích: chi phí thấp, thao tác đơn giản, tốc độ đáp ứng nhanh, độ nhạy/chính xác cao và hạn chế thất thoát mẫu. Thiết bị gọn nhẹ và xử lý mẫu đơn giản còn cho phép phát triển thành hệ thống cầm tay phục vụ phân tích hiện trường. Tuy nhiên, độ ổn định của điện cực trong quá trình đo vẫn là thách thức cần giải quyết.

Khác biệt với phương pháp xét nghiệm sinh học trong phòng thí nghiệm (như ELISA, SIMOA), cảm biến miễn dịch điện hóa có lợi thế vượt trội về tiềm năng thu nhỏ hóa [16-20]. Thiết bị POCT sử dụng lượng thuốc thử thấp và thường dùng một lần, nên giảm đáng kể chi phí và rất phù hợp ứng dụng tại điểm chăm sóc [21]. Mức độ tự động hóa có thể được nâng cao bằng cách tích hợp bộ phận xử lý chất lỏng (ví dụ: chip vi lưu) để tạo nền tảng tự động hóa quy trình chuẩn bị mẫu và phát hiện [22]. Tầm quan trọng của hệ thống chẩn đoán thu nhỏ, tự động, di động càng được nhấn mạnh trong đại dịch, khi cần hạn chế tiếp xúc trực tiếp giữa người nhiễm bệnh và cơ sở y tế [2].

Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn và kết quả khảo sát tài liệu trong nước/quốc tế, nghiên cứu này tập trung vào thiết kế, chế tạo thiết bị vi lưu tích hợp cảm biến điện hóa định hướng ứng dụng trong xét nghiệm y-sinh.

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 nghiên cứu 1: 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 lỏng được sử dụng để theo dõi số lượng bản sao DNA.

Nội dung nghiên cứu 2: Nghiên cứu chế tạo cảm biến trên cơ sở sử dụng graphen oxit dạng khử - rGO và polyaniline – PANi để theo dõi sự thay đổi pH của dung dịch sản phẩm trong quá trình khuếch đại gen trong toàn bộ quá trình khuếch đại DNA của phản ứng LAMP. Đầu tiên, màng mỏng được chế tạo thông qua quá trình khử điện hóa oxit graphene bằng phương pháp nhỏ phủ, và tiếp theo là quá trình mạ điện của PANi trong dung dịch axit. Các phép đo thế mạch hở (OCP) được sử dụng để phát hiện sản phẩm DNA được khuếch đại.

Nội dung nghiên cứu 3: Nghiên cứu chế tạo, tối ưu thiết kế hệ vi lưu để tích hợp cảm biến điện hóa và sử dụng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP. Phát triển từ các kết quả đã đạt được trong nội dung nghiên cứu 1 với các phép đo điện hóa được thực hiện trong hệ vi lưu đơn giản, và nội dung 2 với nghiên cứu chế tạo nâng cao độ nhạy của cảm biến trên cơ sở sử dụng phương pháp LAMP, đối với nội dung nghiên cứu 3, luận án tập trung nghiên cứu tối ưu hệ vi lưu về mặt kích thước, tích hợp sẵn một số thiết bị ngoại vi như điện cực, lò nhiệt... Nội dung nghiên cứu 3 bao gồm: mô phỏng một số thành phần của hệ vi lưu tích hợp: kênh vi lưu, đế nhiệt platinum; nghiên cứu thiết kế, chế tạo hệ vi lưu tích hợp gồm điện cực, đế nhiệt, kênh vi lưu để tối ưu cho việc phát triển thành thiết bị xét nghiệm tại chỗ.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

Những phương pháp phân tích y sinh truyền thống đang được sử dụng hiện nay đã được cải tiến nhiều, phổ kết quả rộng, độ chính xác cao nhưng đi kèm với đó là yêu cầu cao hơn ở phương diện kỹ thuật xử lý, thiết bị, sinh phẩm và hoá chất sử dụng đắt tiền. Do đó, các cơ sở phân tích truyền thống này chủ yếu được đặt ở những thành phố phát triển. Những vùng nông thôn, miền núi, hải đảo khó tiếp cận được những phương pháp xét nghiệm chẩn đoán này. Để khắc phục tồn tại trên, luận án NCS của tôi hướng tới phát triển đồng bộ kỹ thuật và thiết bị phân tích mới, trong đó tập trung vào việc thu nhỏ thiết bị mà vẫn giữ độ nhạy, độ chọn lọc, giảm thời gian phân tích và lượng mẫu sử dụng.

Luận án tập trung vào phát triển hệ vi lưu tích hợp các thiết bị ngoại vi, tối ưu cho phát hiện điện hóa pha lỏng và phương pháp khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt LAMP. Để phát triển được thiết bị hoàn chỉnh, trước tiên, luận án đã tập trung thiết kế, chế tạo hệ vi lưu với thiết kế đơn giản, sử dụng vật liệu là Polydimethylsiloxane (PDMS), cảm biến điện hóa có sẵn (thương mại và do nhóm tự chế tạo) để theo dõi, giám sát phản ứng khuếch đại DNA trong phản ứng LAMP. Các kỹ thuật quét thế vòng, thế không đổi đã được triển khai để nghiên cứu các tính chất điện hóa tại đây.

Những đóng góp mới của luận án:

Luận án đã góp phần quan trọng trong việc thiết kế, chế tạo và gắn kết hệ kênh phản ứng kích thước nhỏ tích hợp hệ điện cực có khả năng ghép nối với mạch đo, trên cơ sở đó làm giảm lượng mẫu phân tích, làm tăng tỷ lệ tín hiệu/nhiều khi đo lường. Kết hợp vi lưu với vật liệu dẫn (graphene, polyaniline, vật liệu 2D, nano-kim loại) đang là xu hướng, vì có thể vừa tổng hợp vật liệu trên chip, vừa dùng chính vật liệu đó làm điện cực cảm biến hoặc phần tử chức năng Hiện tại, đây là vấn đề nghiên cứu còn mới tại Việt Nam.

Bố cục của luận án:

Luận án được trình bày trong 101 trang (không kể phần mục lục và danh mục các tài liệu tham khảo).

Cấu trúc của luận án gồm:

Mở đầu

1. Tổng quan tài liệu
2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu
3. Kết quả và thảo luận

Kết luận

Các kết quả chính của luận án đã được công bố trong 05 công trình khoa học, trong đó có 04 bài báo được đăng trên tạp chí chuyên ngành quốc tế ISI, và 01 báo cáo tại hội nghị quốc tế.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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

Nhiều bệnh truyền nhiễm gây bùng phát dịch và trở thành mối lo ngại lớn trong thế giới hiện đại bao gồm: virus dengue (DENV), virus Ebola (EBV), virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus Zika (ZIKV), virus cúm, virus viêm gan và gần đây nhất là COVID-19. Khả năng lây lan nhanh chóng khiến các loại virus này có tính ổn định về mặt di truyền và trở thành mối đe dọa thường trực đối với sức khỏe cộng đồng. Việc phát hiện các virus gây bệnh một cách nhanh chóng và chính xác là yêu cầu cấp thiết do các yếu tố hạn chế như: tốc độ chẩn đoán chậm, tỷ lệ âm tính giả và dương tính giả gia tăng, cũng như yêu cầu về các bộ kit bổ sung.

Các nhà nghiên cứu đã nỗ lực phát triển các phương pháp và thiết bị thay thế nhằm vượt qua những thách thức này. Trong đó, việc sử dụng cảm biến sinh học điện hóa (electrochemical biosensors) trong các ứng dụng môi trường, nông nghiệp cũng như trong xét nghiệm lâm sàng đã được chấp nhận rộng rãi. Các cảm biến sinh học điện hóa đo glucose thường được sử dụng để theo dõi đường huyết, hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường, cũng như phát hiện bệnh celiac, ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt, cùng nhiều bệnh lý khác [23].

Sự tiến bộ trong nghiên cứu công nghệ vi lưu (microfluidics) và chip sinh học (biochip) đã tạo nên cuộc cách mạng trong chẩn đoán phân tử, cung cấp công cụ tiên tiến cho phép thu nhỏ hóa hệ thống phân tích, sàng lọc nhanh chóng tác nhân gây bệnh với độ nhạy cao, đồng thời khắc phục triệt để những nhược điểm cố hữu khi tích hợp phương pháp khuếch đại acid nucleic thông thường như yêu cầu về không gian phòng thí nghiệm, thời gian xử lý kéo dài và chi phí vận hành đắt đỏ.

Chip sinh học (biochip), một thành tựu đột phá của công nghệ sinh học thế kỷ 21, được định nghĩa là thiết bị vi mô tích hợp các thành phần sinh học hoạt tính (bao gồm DNA, kháng thể, enzyme, thụ thể tế bào) trên nền vật liệu rắn như silicon, thủy tinh hoặc polymer. Tương tự cách vi mạch điện tử xử lý hàng triệu phép tính trong một giây, một biochip có khả năng thực hiện hàng ngàn phản ứng sinh học đồng thời chỉ trong vài giây nhờ mật độ cao các điểm phản ứng vi mô. Ứng dụng của biochip trải rộng trên đa dạng lĩnh vực: từ nghiên cứu bộ gene và phát triển giống cây trồng chống chịu bệnh trong nông nghiệp; kiểm nghiệm độc tố mycotoxin, dư lượng kháng sinh, protein dị ứng và chỉ tiêu hóa sinh trong an toàn thực phẩm; phát hiện nhanh các chủng vi khuẩn gây bệnh (như Salmonella, E. coli) trong nước uống, thực phẩm tươi sống và mẫu bệnh phẩm lâm sàng; đến giám sát tác nhân hóa-sinh học trong chiến tranh sinh học và khủng bố sinh học. Đặc biệt, trong y học cá thể hóa, biochip

cho phép chẩn đoán sớm các bệnh nan y (như ung thư vú, nhiễm trùng huyết) ở giai đoạn tiền lâm sàng mà phương pháp chẩn đoán hình ảnh thông thường khó phát hiện, đồng thời theo dõi động học tương tác phân tử (protein-DNA, thuốc-thụ thể tế bào) để làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh và phát triển liệu pháp đích cá thể hóa [24,25,26]. Một minh họa điển hình là chip protein microarray phát hiện đồng thời 12 cytokine gây viêm trong hội chứng COVID-19 nặng, cung cấp dữ liệu tiên lượng bệnh chính xác hơn so với xét nghiệm ELISA đơn lẻ [27].

Song hành không thể tách rời với biochip, công nghệ vi cơ lỏng (microfluidics) - lĩnh vực nghiên cứu đa ngành kết hợp vi cơ điện tử (MEMS/NEMS), khoa học vật liệu và kỹ thuật y sinh - tập trung vào việc điều khiển chính xác dòng chất lưu (chất lỏng Newton/phi Newton, khí hoặc hỗn hợp khí-lỏng) ở thể tích cực nhỏ (picoliter đến microliter) trong các cấu trúc vi kênh có kích thước đặc trưng từ 10-500 μm . Sự vận hành của hệ vi lưu dựa trên các hiện tượng vật lý vi mô đặc thù: dòng chảy tầng (laminar flow) - nơi các lớp chất lỏng chảy song song với số Reynold thấp (<2300) tạo điều kiện kiểm soát không gian phản ứng; điện thẩm (electroosmosis) - cơ chế vận chuyển ion dưới tác dụng điện trường qua lớp điện kép Helmholtz-Smoluchowski; lực mao dẫn - đóng vai trò chủ đạo trong thiết bị vi lưu giấy (paper-based microfluidics); và khuếch tán nhiệt - yếu tố then chốt trong thiết kế bộ vi nhiệt PCR. Những hiệu ứng này cho phép thao tác tinh vi các quá trình: trộn lẫn đa dòng chất lỏng, ly tâm vi thể tích trên chip, điện di vi mao quản, và tách tế bào bằng vi lọc hoặc lực quán tính (inertial focusing). Chất lưu được xử lý trong hệ thống này bao gồm máu (mẫu thô hoặc mẫu đã qua xử lý), dịch não tủy, nước bọt, tế bào ung thư tuần hoàn (CTC), bào tử vi khuẩn, acid nucleic, và các thuốc thử phản ứng sinh hóa, hoạt động trong các cấu trúc tích hợp như vi bơm áp điện (piezoelectric micropump), vi van nhiệt điện (thermopneumatic microvalve) và vi bộ lọc kích thước nano (nanoporous membrane) [28].

Về phương diện công nghệ chế tạo, thiết bị vi lưu thế hệ đầu thường sử dụng silica hoặc thủy tinh borosilicate nhờ độ bền hóa học cao và khả năng tạo kênh bằng kỹ thuật khắc ion sâu (DRIE), nhưng dần được thay thế bằng vật liệu polymer do giá thành hợp lý và tính linh hoạt trong gia công. Polydimethylsiloxane (PDMS) chiếm vị trí hàng đầu nhờ tính trong suốt quang học, mô đun đàn hồi thấp cho phép tạo van cơ học, và khả năng tạo khuôn nhanh bằng kỹ thuật soft lithography từ master silicon. Các polymer nhiệt dẻo như polycarbonate (PC) và polymethyl methacrylate (PMMA) được gia công hàng loạt bằng laser ablation CO_2 hoặc ép nóng (hot embossing), trong khi vật liệu giấy nitrocellulose mở ra hướng phát triển thiết bị "lab on paper" giá rẻ, thân thiện môi trường cho vùng tài nguyên hạn chế. Xu hướng gần đây là kết hợp đa vật liệu (PDMS-thủy tinh, giấy-PMMA) để tối ưu hóa từng chức năng hệ thống [29].

Trong hệ vi lưu, các vi kênh không chỉ dùng để dẫn và phân tích mẫu mà còn hoạt động như một “vi lò phản ứng” (microreactor) rất hiệu quả cho tổng hợp hoá học và vật liệu, đặc biệt là hạt nano. Trong kênh có kích thước micromet, số Reynolds rất nhỏ nên dòng chảy hầu như luôn ở trạng thái tầng (laminar): các lớp chất lỏng trượt song song, không cuộn xoáy. Điều này giúp thời gian lưu (residence time) của từng phần tử chất lỏng được xác định khá chính xác theo lưu lượng và thể tích kênh, không bị “trộn lẫn” ngẫu nhiên như trong bình khuấy [28].

Khi tổng hợp hạt nano, thời gian các ion/tiền chất trải qua giai đoạn tạo mầm – lớn lên – kết tinh quyết định trực tiếp kích thước và phân bố kích thước. Trong microreactor, chỉ cần điều chỉnh lưu lượng bơm (tức là thay đổi thời gian lưu) là có thể dịch chuyển điểm phản ứng từ vùng tạo mầm sang vùng lớn lên, nhờ đó thu được hạt có kích thước rất đồng đều; trong khi ở phản ứng thông thường (batch reaction), cùng lúc tồn tại nhiều vùng thời gian lưu khác nhau nên hạt thường phân bố rộng.

Kênh vi lưu có tỉ lệ diện tích bề mặt/thể tích rất lớn nên truyền nhiệt và truyền khối cực nhanh. Chỉ cần đặt kênh lên một đế nhiệt hoặc dùng các vùng gia nhiệt cục bộ là có thể tạo gradient nhiệt độ chính xác dọc theo chiều dài kênh. Tương tự, khi đưa 2–3 dòng dung dịch khác nhau vào cùng một kênh, do dòng chảy tầng nên chúng chảy song song, khuếch tán vào nhau từ từ, tạo nên gradient nồng độ (gradient hoá) rất mượt theo chiều ngang hoặc chiều dọc.

Nhờ các gradient này, chỉ trên một con chip có thể đồng thời khảo sát nhiều điều kiện phản ứng (nhiệt độ, pH, tỉ lệ tiền chất, chất khử, chất pha tạp/dopant) mà không cần nhiều bình phản ứng riêng lẻ. Kết quả là ta nhanh chóng tìm được vùng điều kiện cho hạt nano có hình dạng (cầu, que, tấm), kích thước, mức độ pha tạp tốt nhất.

Kiểm soát kích thước, hình dạng, dopant tốt hơn phản ứng truyền thống Trong bình phản ứng thông thường, trộn khuấy chỉ tạo ra các vùng “trung bình” về nhiệt độ và nồng độ mà ở mức vi mô luôn tồn tại nhiều vùng khác nhau như vùng nóng – vùng lạnh, vùng giàu – vùng nghèo tiền chất. Những khác biệt ở cấp độ vi mô này dẫn tới tạo mầm không đồng nhất, hạt sinh ra ở thời điểm khác nhau, trong điều kiện khác nhau → phân bố kích thước rộng, khó tái lập. Ngược lại, trong microreactor, mỗi “đoạn” chất lỏng đi qua kênh đều trải qua vùng phân bố nhiệt độ – nồng độ giống nhau, do đó hạt được tạo ra trong điều kiện gần như lặp lại; điều này làm giảm độ lệch chuẩn kích thước rất mạnh.

Ta có thể thiết kế vùng tạo mầm rất ngắn, vùng lớn lên dài hơn, nhờ điều chỉnh chiều dài từng đoạn kênh và lưu lượng; như vậy, số mầm được tạo ra cố định còn kích thước hạt điều chỉnh bằng thời gian lớn lên, cho phép chủ động chọn kích thước.

Khi bổ sung chất pha tạp (dopant) trong một trong các dòng vào, do trộn khuếch tán có kiểm soát, tỉ lệ dopant trong mỗi hạt ít biến động hơn, giúp mức độ pha tạp đồng đều, quan trọng với vật liệu quang – điện – xúc tác.

Vi lưu, với dòng chảy tầng, thời gian lưu xác định và khả năng tạo gradient nhiệt/hoá chính xác, biến kênh vi mô thành một vi lò phản ứng có khả năng điều khiển rất cao, vượt trội so với các bình phản ứng truyền thống trong việc tổng hợp hạt nano và vật liệu chức năng có kích thước, hình dạng và mức độ dopant được kiểm soát chặt chẽ.

Ứng dụng thực tiễn nổi bật nhất của hệ thống tích hợp vi lưu-biochip (được gọi là Lab-on-a-Chip - LOC) là trong lĩnh vực chẩn đoán tại điểm chăm sóc (POCT). Các thiết bị này tự động hóa toàn bộ quy trình từ chuẩn bị mẫu (ly giải tế bào bằng xung điện, tách DNA bằng hạt silica từ tính), khuếch đại acid nucleic (PCR vi lưu, LAMP đẳng nhiệt), đến phát hiện tín hiệu (điện hóa, huỳnh quang, plasmon bề mặt) trên một nền tảng duy nhất có kích thước chỉ vài centimet. Ví dụ điển hình là hệ thống GeneXpert® của Cepheid - được WHO tiên thẩm định cho chẩn đoán lao đa kháng thuốc và MRSA - tích hợp tách chiết DNA, khuếch đại PCR thời gian thực và phát hiện đa kênh huỳnh quang trong ống nghiệm kín. Trong đại dịch COVID-19, chip vi lưu phát hiện SARS-CoV-2 qua kỹ thuật RT-LAMP kết hợp đo pH điện hóa (như nghiên cứu của Zhang et al. 2020) cho kết quả định lượng sau 35 phút với độ nhạy 10 bản copy/ μL , minh chứng cho tính ưu việt: tiết kiệm >95% thể tích mẫu (chỉ cần 2 μL so với 200 μL của PCR ống nghiệm), tự động hóa toàn bộ quy trình, rút ngắn thời gian xét nghiệm từ 4 giờ xuống 40 phút, và tính di động cao cho xét nghiệm hiện trường [30-39].

Tuy nhiên, công nghệ này vẫn đối mặt với những thách thức kỹ thuật đáng kể: (1) Hiệu ứng nền mẫu (matrix effect) trong dịch sinh học phức tạp (máu, đờm) gây nhiễu tín hiệu phát hiện; (2) Sự hấp phụ không đặc hiệu của protein lên bề mặt PDMS làm giảm hiệu suất phản ứng; (3) Sự khuếch tán khí qua thành PDMS ảnh hưởng đến phản ứng enzyme nhạy oxy; (4) Độ biến thiên giữa các lô chế tạo do phụ thuộc vào kỹ thuật gia công thủ công; và (5) Chi phí sản xuất hàng loạt cho ứng dụng quy mô dân số. Xu hướng nghiên cứu tương lai tập trung vào: (1) Phát triển thế hệ chip lai quang-điện tử (optofluidic) kết hợp cảm biến plasmonic bề mặt (SPR) và transistor hiệu ứng trường (FET); (2) Tích hợp trí tuệ nhân tạo (AI) để tự động phân tích dữ liệu hình ảnh tế bào và tối ưu hóa điều kiện phản ứng; (3) Hệ thống organ-on-a-chip mô phỏng chức năng phổi, gan, ruột trên vi mạch nhằm nghiên cứu cơ chế nhiễm trùng và sàng lọc thuốc kháng virus; và (4) Công nghệ in 3D đa vật liệu cho phép chế tạo chip có kiến trúc phân cấp phức tạp.

1.2. Cảm biến sinh học điện hóa

1.2.1. Phân loại cảm biến sinh học

Cảm biến điện hoá tích hợp trên chip là “trái tim” của hệ vi lưu phân tích, vì nó cho phép đo trực tiếp các tín hiệu dòng/điện thế ngay trong kênh với lượng mẫu rất nhỏ.

Cấu trúc điện cực tích hợp

Trên nền chip (thường là thủy tinh, Si/SiO₂ hoặc polymer), người ta lắng đọng các vi điện cực bằng vàng, carbon, ITO hoặc mực dẫn in (screen-printed). Cấu trúc về mặt hình học thường là hệ ba điện cực vi mô: điện cực làm việc (WE) đặt ngay trong kênh hoặc buồng phản ứng; điện cực đối (CE) và điện cực tham chiếu (RE, thường là Ag/AgCl) bố trí gần đó. Kích thước điện cực (bề rộng vài–vài chục μm , chiều dài vài trăm μm) giúp diện tích bề mặt đủ lớn để thu tín hiệu nhưng vẫn phù hợp với kích thước kênh vi lưu [40].

Nguyên lý đo ngay trong kênh

Khi dung dịch chảy trong kênh, chất phân tích (ion, phân tử nhỏ, DNA, hạt nano...) tiếp cận bề mặt điện cực. Bằng các kỹ thuật như voltammetry (CV, SWV), chronoamperometry hoặc phổ trở kháng (EIS), cảm biến đo được dòng điện, điện thế hoặc trở kháng phát sinh từ quá trình oxy hoá-khử hoặc tương tác bề mặt. Vì điện cực nằm trực tiếp trong kênh nên không cần lấy mẫu ra ngoài, tránh mất mẫu và nhiễm bẩn; đồng thời có thể theo dõi theo thời gian thực sự thay đổi nồng độ hoặc trạng thái vật liệu trong quá trình phản ứng [41].

Độ nhạy cao và đáp ứng nhanh

Vi điện cực có kích thước rất nhỏ nên lớp khuếch tán mỏng, chất phân tích tới bề mặt chủ yếu bằng khuếch tán hình bán cầu; điều này làm dòng nền thấp nhưng dòng Faraday tương đối lớn, tăng tỷ số tín hiệu/nhiều. Thể tích kênh nhỏ, khoảng cách từ vùng phản ứng tới điện cực ngắn \rightarrow thời gian chất phân tích khuếch tán đến bề mặt chỉ vài mili-giây đến giây, nên cảm biến phản hồi rất nhanh với thay đổi trong kênh (ví dụ sản phẩm LAMP vừa sinh ra, hạt nano mới hình thành) [42, 43].

Vật liệu điện cực (Au, carbon, ITO, điện cực in)

Vàng (Au): dẫn điện tốt, hoá học trơ, vùng thế làm việc rộng, dễ chức năng hoá bằng các lớp SAM thiol nên rất phù hợp cảm biến sinh học (DNA, protein) và điện hoá phức tạp.

Carbon (C, CNT, graphene, carbon ink): nền rẻ, ít nhiễu, tương thích sinh học tốt, dễ biến tính với polymer dẫn (PANi, PEDOT...) hoặc nano-kim loại để tăng độ nhạy.

ITO/FTO: trong suốt, cho phép kết hợp đo điện hoá với quan sát quang học/phát quang; thường dùng trong cảm biến quang-điện hoá, điện cực phim mỏng.

Điện cực in (screen-printed/sputter-printed): chi phí thấp, có thể dùng một lần, dễ tích hợp vào cartridge cầm tay; phù hợp các hệ POCT (point-of-care) [42,43].

Khả năng tích hợp với hệ điều khiển cầm tay

Do dòng và thế đo được thường ở mức μA – mV , chỉ cần các mạch đo nhỏ gọn (potentiostat, nguồn dòng, ADC) là đủ; có thể tích hợp vào bo mạch cầm tay, kết nối Bluetooth hoặc USB với máy tính/điện thoại. Tín hiệu từ vi điện cực trong kênh được số hoá và xử lý bằng phần mềm để suy ra nồng độ chất phân tích, tốc độ phản ứng, trạng thái vật liệu... Từ đó hình thành thiết bị lab-on-a-chip cầm tay, sử dụng rất ít mẫu, cho kết quả nhanh, phù hợp triển khai ngoài hiện trường hoặc tại giường bệnh.

Cảm biến sinh học được phân loại chủ yếu dựa trên cơ chế chuyển đổi tín hiệu sinh học, bao gồm ba nhóm chính: quang học, từ tính và điện hóa. Cảm biến sinh học quang học hoạt động bằng cách tương quan cường độ tín hiệu ánh sáng với nồng độ chỉ dấu sinh học mục tiêu [8,40]. Trong nhóm này, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) nổi bật nhờ khả năng phát hiện thời gian thực dựa trên nguyên lý tạo sóng plasmon: khi phân tử đích (ví dụ kháng nguyên) liên kết với kháng thể cố định trên bề mặt cảm biến, sự thay đổi chiết suất cục bộ dẫn đến dịch chuyển góc cộng hưởng, cho phép định lượng chính xác ở ngưỡng $\sim 1 \text{ pg/mm}^2$. Song song đó, cảm biến sinh học từ tính ghi nhận tương tác sinh học thông qua biến đổi đặc tính từ (như từ trở hoặc từ cảm) khi hạt nano từ tính gắn phân tử đích tương tác với bề mặt. Kỹ thuật này đặc biệt hiệu quả trong xử lý mẫu sinh học phức tạp (mẫu đực) do không bị ảnh hưởng bởi nhiễu quang học và được ứng dụng trong xét nghiệm nhanh bệnh lao, phát hiện tế bào ung thư tuần hoàn (CTC).

Cảm biến sinh học điện hóa chiếm vị trí đặc biệt quan trọng do cơ chế chuyển đổi trực tiếp tương tác sinh học thành tín hiệu điện (dòng điện, điện thế hoặc trở kháng) tỷ lệ với nồng độ chất phân tích [44]. Nhóm này bao gồm ba phương pháp đo chính: (1) Ampêrometry theo dõi dòng Faraday trong ứng dụng như đo glucose máu, (2) Potentiometry đo biến thiên điện thế để phát hiện ion đặc hiệu, và (3) Phổ trở kháng điện hóa (EIS) phân tích biến đổi trở kháng bề mặt điện cực để phát hiện acid nucleic (DNA/RNA) của virus.

Việc lựa chọn kỹ thuật cảm biến phụ thuộc vào [20,44]:

- Hệ số phẩm chất (FOM): Độ nhạy/giới hạn phát hiện (LOD);
- Tính di động: Kích thước thiết bị, nhu cầu nguồn điện;

- Độ phức tạp mẫu: Yêu cầu tiền xử lý (ví dụ: mẫu máu cần ly tâm);
- Thời gian đáp ứng: Từ vài giây (điện hóa) đến 30 phút (SPR);
- Chi phí tổng thể: Bao gồm thiết bị đọc và linh kiện tiêu hao.

Đổi với xét nghiệm tại chỗ (POCT), cảm biến điện hóa thể hiện ưu thế vượt trội nhờ tiềm năng thu nhỏ hóa mạnh mẽ (điện cực in lưới carbon kích thước $<1 \text{ cm}^2$), chi phí sản xuất cực thấp ($<0.1 \text{ USD/đơn vị}$), và khả năng tích hợp với thiết bị di động thông qua kết nối Bluetooth. Những ưu điểm này tương phản rõ rệt với cảm biến quang học thường đòi hỏi hệ thống quang học cồng kềnh và đắt tiền. Các thách thức về tính chọn lọc và nhiễu nền ma trận (matrix interference) trong cảm biến điện hóa đã được giải quyết thông qua ba hướng tiếp cận chính: (1) Sử dụng màng chọn lọc ion (ví dụ Nafion®) để loại bỏ chất gây nhiễu điện hóa trong máu, (2) Ứng dụng vật liệu nano lai như graphene/PEDOT:PSS nâng cao độ chọn lọc lên 10^5 lần, và (3) Tối ưu hóa cấu trúc kháng thể đơn dòng (mAb) để giảm phản ứng chéo. Minh chứng thực tiễn là kit xét nghiệm COVID-19 điện hóa (ví dụ Abbott i-STAT) cho kết quả trong 4 phút với độ đặc hiệu $>99\%$, khẳng định vị trí không thể thay thế của công nghệ này trong chẩn đoán phân tán [20,44].

1.2.2. Phân tích điện hóa

Phân tích điện hóa đã khẳng định vị trí quan trọng trong định lượng thành phần sinh học nhờ khả năng chuyển đổi tín hiệu sinh học thành tín hiệu điện định lượng. Cảm biến sinh học điện hóa hoạt động dựa trên phân tử nhận biết sinh học (enzyme, kháng thể hoặc aptamer) - thành phần cốt lõi gắn đặc hiệu với mục tiêu phân tích và chuyển hóa tương tác sinh học thành tín hiệu điện, đóng vai trò như bộ chuyển đổi tín hiệu. Hệ thống ba điện cực tiêu chuẩn bao gồm: điện cực làm việc (WE) nơi xảy ra phản ứng điện hóa đặc hiệu (thường chế tạo từ vàng, carbon hoặc graphene để tối ưu độ nhạy); điện cực so sánh (RE) thiết lập điện thế chuẩn ổn định như điện cực Ag/AgCl (+0.197 V) hoặc Cu/CuSO₄ (+0.314 V) không phụ thuộc thành phần dung dịch [45]; và điện cực đối (CE) bằng vật liệu dẫn điện (bạch kim/graphit) hoàn thành mạch điện bằng cách cung cấp dòng điện cân bằng. Trong cấu hình này, khi WE đóng vai trò anode (cực dương), CE sẽ trở thành cathode (cực âm) và ngược lại, tạo thành tế bào điện phân sử dụng dòng điện ngoại để thúc đẩy phản ứng oxy hóa-khử - khác biệt cơ bản với tế bào galvanic tự tạo điện.

Potentiostat đảm nhiệm vai trò trung tâm trong việc kiểm soát chính xác hiệu điện thế giữa WE và RE đồng thời đo dòng điện tại WE [46]. Các tương tác sinh học (như phản ứng enzyme-cơ chất hoặc liên kết kháng thể-kháng nguyên) gây biến đổi đặc tính hóa-lý tại bề mặt WE, được phát hiện thông qua ba kỹ thuật chính:

amperometry đo dòng faradaic sinh ra từ phản ứng oxy hóa/khử trực tiếp (ví dụ: phản ứng glucose oxidase tạo H_2O_2); potentiometry theo dõi biến thiên điện thế do thay đổi nồng độ ion; và phổ trở kháng điện hóa (EIS) phát hiện thay đổi trở kháng bề mặt khi phân tử đích liên kết [47]. Môi trường điện ly đóng vai trò thiết yếu cho quá trình tạo tín hiệu, thông qua dung dịch đầu dò oxy hóa-khử (như $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ hoặc methylene blue) chứa các ion có khả năng chuyển điện tử. Khi điện thế được đặt vào WE, các cation (ion dương) di chuyển về phía cathode để nhận điện tử (quá trình khử), trong khi anion (ion âm) di chuyển về anode để nhường điện tử (quá trình oxy hóa). Đối với phân tử điện trở như protein hoặc DNA, dung dịch đầu dò đóng vai trò trung gian chuyển điện tử thiết yếu, trong khi với cơ chất điện hoạt (như glucose), phản ứng enzyme trực tiếp tạo ra điện tử.

Các phản ứng điện hóa xảy ra tại bề mặt phân cách điện cực-dung dịch tạo nên "dòng chuyển điện tích" được khảo sát bằng kỹ thuật potentiostatic. Dòng faradaic - dòng điện thực từ phản ứng oxy hóa/khử tuân theo định luật Faraday - khác biệt cơ bản với dòng không faradaic (dòng tạp) sinh ra từ sự tái sắp xếp thuần túy của lớp điện kép Helmholtz mà không có chuyển giao điện tử. Mọi biến đổi trong quá trình chuyển điện tích đều có thể định lượng liên hệ với nồng độ phân tử đích, tạo nền tảng cho các ứng dụng thực tiễn như cảm biến glucose cấy dưới da theo dõi liên tục, phát hiện SARS-CoV-2 thông qua đo biến thiên trở kháng với độ nhạy 0.8 pg/mL, hoặc giám sát ô nhiễm kim loại nặng bằng điện cực ion chọn lọc trong môi trường nước.

Thống kê trên hệ thống sciencedirect.com, hệ thống công bố khoa học lớn nhất hiện nay, với từ khóa "Electrochemical Analysis" (phân tích điện hóa) trong giai đoạn 2022 - 2026, chúng ta thu được 25.709 công trình công bố trong đó có 449 tài liệu trong các sách chuyên ngành và 22.450 bài báo liên quan trực tiếp. Theo thời gian, số lượng và chất lượng công trình công bố tăng rất nhanh. Tìm hiểu trong thời gian từ 2022 đến 2025 tác giả nhận thấy có sự gia tăng liên tục về số công bố bao gồm tạp chí, sách và sách tham khảo. Trong năm 2022, có 4.378 bài báo trên hệ thống ISI công bố kết quả nghiên cứu kỹ thuật điện hóa ứng dụng trong phân tích y sinh, đến năm 2025 hiện tại đã có 6.975 bài báo công bố.

Trải qua gần một thế kỷ nghiên cứu và phát triển, phân tích điện hóa đã có rất nhiều cải tiến. Tuy nhiên, kỹ thuật phân tích điện hóa giờ đây vẫn cần sự hoàn thiện và điều chỉnh cho phù hợp với sự phát triển của khoa học, công nghệ, đặc biệt là công nghệ nano nơi mà kích thước vật liệu, điều kiện biên của bài toán điện hóa thay đổi. Nghiên cứu và phát triển kỹ thuật phân tích điện hóa cần được thực hiện ở khâu tối ưu hóa phần mềm, tính toán, thu thập và xử lý số liệu; phát triển phần cứng: xử lý

nhanh hơn, mạnh hơn, tích hợp công nghệ truyền tải dữ liệu; chế tạo đầu đo tích hợp cho phép thu được nhiều thông số; thu nhỏ thể tích mẫu đo; chế tạo hệ thống điện hóa cầm tay.

1.2.3. Kỹ thuật đo trong cảm biến điện hóa

Cảm biến sinh học điện hoá sử dụng đa dạng phương pháp đo bao gồm: đo dòng đa bước (Multistep Amperometry - MA), quét thế tuyến tính (Linear Sweep Voltammetry - LSV), và đo thế mạch hở (Open Circuit Potential - OCP). Nhìn chung, bốn nguyên lý cơ bản chi phối các kỹ thuật này là: (1) đo thế tĩnh, (2) đo xung thế, (3) đo dòng động, và (4) đo phổ trở kháng. Đối với ứng dụng đặc thù trong phát hiện sản phẩm khuếch đại acid nucleic, luận án tập trung nghiên cứu ba kỹ thuật trọng tâm: quét thế tuần hoàn (Cyclic Voltammetry - CV), phổ trở kháng điện hóa (Electrochemical Impedance Spectroscopy - EIS), và thế xung vi sai (Differential Pulse Voltammetry - DPV) [21].

Phương pháp quét thế tuần hoàn (CV) hoạt động bằng cách áp đặt điện thế quét hình tam giác lên điện cực làm việc (WE) trong khoảng xác định, đồng thời ghi nhận dòng điện đáp ứng. Quá trình oxy hóa-khử tại bề mặt điện cực tạo ra cặp peak đặc trưng: peak dòng oxy hóa (anodic) và khử (cathodic). Diện tích dưới peak tỷ lệ thuận với nồng độ chất điện hoạt, cho phép định lượng chính xác chỉ dấu sinh học như methylene blue hoặc $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ - các chất chỉ thị thường dùng trong phát hiện acid nucleic [48,49]. Độ chênh thế giữa hai peak (ΔE_p) phản ánh tính thuận nghịch của phản ứng, với giá trị lý tưởng đạt 59 mV cho hệ một electron.

Cụ thể, điện thế được quét tuyến tính từ một giá trị ban đầu đến một điện thế đỉnh (vertex potential), sau đó chiều quét được đảo ngược để đưa điện thế trở lại giá trị ban đầu hoặc đến một điện thế đỉnh khác. Quá trình này tạo ra một đường cong voltammogram tuần hoàn, biểu diễn sự phụ thuộc của dòng điện vào điện thế. Phân tích dòng điện tại các đỉnh oxy hóa (I_{pa}) và đỉnh khử (I_{pc}), cũng như các giá trị điện thế đỉnh tương ứng (E_{pa} và E_{pc}), cung cấp thông tin định tính và định lượng về các quá trình oxy hóa-khử xảy ra trên bề mặt điện cực làm việc. Trong ứng dụng cảm biến sinh học axit nucleic, sự thay đổi tín hiệu CV của một chất dò oxy hóa-khử (ví dụ, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ hoặc Methylene Blue) do sự cố định hoặc lai hóa DNA trên bề mặt điện cực, hoặc do tương tác với các chất xen kẽ có hoạt tính oxy hóa-khử, thường được sử dụng để xác định sự hiện diện của phân tử sinh học trong dung dịch phân tích. CV rất hữu ích trong việc đặc trưng hóa các biến đổi bề mặt điện cực và nghiên cứu cơ chế phản ứng.

Phương pháp phổ trở kháng (EIS) khảo sát đáp ứng tần số của hệ điện hóa thông qua việc áp đặt nhiễu điện thế AC biên độ nhỏ (5-10 mV) trên nền thế DC cố định. Dữ liệu thu được biểu diễn dưới dạng giản đồ Nyquist (trục hoành: Z' - thành phần thực, trục tung: Z'' - thành phần ảo), được mô hình hóa bằng mạch điện tương đương. EIS là một kỹ thuật mạnh mẽ để nghiên cứu các tính chất của bề mặt điện cực/dung dịch điện ly. Cụ thể, một tín hiệu xoay chiều có biên độ nhỏ được áp đặt lên hệ điện hóa qua một dải tần số rộng (từ giá trị cao đến thấp), trong khi duy trì một điện thế một chiều cố định. Tổng trở phức của hệ ($Z=Z'+jZ''$) được đo như một hàm của tần số. Giản đồ Nyquist thực nghiệm sau đó thường được mô phỏng bằng một mạch điện tương đương (ví dụ, mạch Randles), trong đó mỗi phần tử của mạch (như điện trở dung dịch R_s , điện dung lớp kép C_{dl} , điện trở chuyển điện tích R_{ct} , và trở kháng Warburg W) đại diện cho một tính chất điện hóa cụ thể của hệ. Đối với cảm biến sinh học điện hóa, sự thay đổi của điện trở chuyển điện tích (R_{ct}) thường là thông số quan trọng nhất. R_{ct} phản ánh sự cản trở đối với việc chuyển electron của một chất dò oxy hóa-khử tại bề mặt điện cực. Sự cố định hoặc lai hóa của axit nucleic trên bề mặt điện cực có thể làm thay đổi R_{ct} (thường là tăng R_{ct} do sự cản trở không gian và tĩnh điện của phân tử DNA đối với chất dò), từ đó cho phép phát hiện và định lượng sự kiện sinh học. EIS có ưu điểm là khả năng phát hiện không cần đánh dấu và cung cấp thông tin chi tiết về những thay đổi ở lớp bề mặt.

Trong cảm biến acid nucleic, sự gia tăng điện trở chuyển điện tử (R_{ct}) do cản trở khuếch tán ion $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ khi DNA mục tiêu liên kết với đầu dò, cung cấp tín hiệu định lượng nhạy với LOD đạt 0.1 fM [48,49]. Thông số quan trọng khác là điện dung lớp kép (C_{dl}) phản ánh thay đổi cấu trúc bề mặt.

Phương pháp thế xung vi sai (DPV) kết hợp xung thế bậc thang với xung vi sai chòong lán, đo hiệu số dòng điện trước/sau mỗi xung. Kỹ thuật này loại bỏ >95% dòng nền tụ điện, cho phép phát hiện nồng độ thấp (nM-pM) trong mẫu sinh học phức tạp. Thông số tối ưu bao gồm: biên độ xung 25-50 mV, thời gian xung 50-100 ms, và bước thế 1-10 mV [50,51]. Ứng dụng điển hình là định lượng DNA khuếch đại qua tín hiệu oxy hóa guanine hoặc chất chỉ thị hoạt tính như daunomycin.

DPV là một kỹ thuật voltammetry xung có độ nhạy cao, được thiết kế để giảm thiểu ảnh hưởng của dòng điện dung nền, từ đó tăng cường tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu so với các kỹ thuật như CV. Trong DPV, các xung điện thế có biên độ nhỏ và thời gian xác định được áp đặt đều đặn lên một đường nền điện thế đang quét từ từ (thường là quét tuyến tính). Dòng điện được lấy mẫu hai lần cho mỗi xung: một lần ngay trước khi áp xung và một lần vào cuối xung. Sự khác biệt giữa hai giá trị dòng điện này

(Δi) được ghi lại và vẽ đồ thị theo điện thế nên, tạo ra một đường voltammogram có dạng đỉnh rõ ràng. Chiều cao của đỉnh DPV tỷ lệ thuận với nồng độ của chất điện hoạt. Trong ứng dụng cảm biến axit nucleic, DPV thường được sử dụng để phát hiện sự thay đổi tín hiệu của một chất chỉ thị hoặc chất đánh dấu oxy hóa-khử (ví dụ, Methylene Blue, các phức kim loại có khả năng xen kẽ vào DNA như $[\text{Co}(\text{GA})_2(\text{aqphen})]\text{Cl}$) khi chúng tương tác với axit nucleic mục tiêu đã được khuếch đại và lai hóa trên bề mặt điện cực. Sự thay đổi này (tăng hoặc giảm dòng đỉnh) phản ánh nồng độ của sản phẩm khuếch đại. Các thông số vận hành quan trọng của DPV bao gồm biên độ xung (ví dụ, 50 mV), độ rộng xung (ví dụ, 60 ms, tương ứng với thời gian chuyển tiếp giữa các mức dòng điện là 0,06s), bước tăng điện thế nền, và khoảng điện thế quét (ví dụ, trong khoảng $\pm 0,3\text{V}$ hoặc tùy thuộc vào chất điện hoạt).

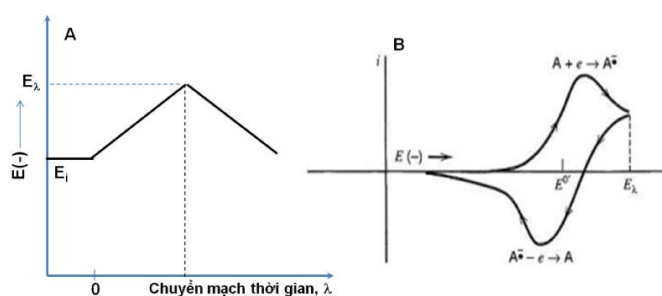
Việc lựa chọn và tối ưu hóa các phương pháp này, cùng với các thông số vận hành cụ thể, là rất quan trọng để đạt được hiệu suất phân tích mong muốn trong việc phát triển cảm biến sinh học điện hóa cho axit nucleic.

1.2.3.1. Phương pháp quét thế vòng tuần hoàn (CV)

Phương pháp quét thế tuần hoàn Von-Ampe (Cyclic Voltametry) được dùng để xác định hệ số khuếch tán và xem xét sự biến thiên thuận nghịch (khả năng có thể phóng và nạp) của vật liệu nghiên cứu, điện thế ở đây biến thiên tuyến tính theo thời gian (Hình 1.1). Nguyên lý cơ bản của phương pháp CV là áp đặt một điện áp biến đổi tuần hoàn vào điện cực làm việc và ghi lại dòng tương ứng [52,53].

Xét quá trình thuận nghịch: $\text{O} + n\text{e} \rightleftharpoons \text{R}$.

Tính từ thời điểm điện thế E_i dương so với E_0 thì chỉ có dòng non-Faraday đi qua. Khi điện thế đạt tới giá trị E_0 thì sự khử bắt đầu và có dòng Faraday đi qua, lúc này điện thế càng dịch về phía âm, nồng độ chất oxy hóa trên bề mặt điện cực giảm và sự khuếch tán tăng lên, do đó dòng điện cũng tăng lên đạt cực đại sau đó do nồng độ chất oxy hóa giảm, do vậy tín hiệu dòng điện sẽ giảm I_{pc} giảm (Hình 1.1).



Hình 1.1. Đồ thị quét thế vòng tuần hoàn CV thời điểm, điện thế quét (A), biểu diễn dòng điện tương ứng (B)

Trường hợp theo thế ngược lại về phía dương, chất khử bị oxi hóa thành chất oxi hóa khi điện thế quay về đến E_0 và dòng anot đi qua. Các vị trí λ và E_λ lần lượt là thời điểm dòng điện và điện thế bắt đầu quét ngược lại. Đường phân cực vòng biểu diễn mối quan hệ giữa dòng điện I (A) và điện thế E (V), trong đó $I_{p,c}$, $I_{p,a}$ là dòng điện cực đại của catốt và anot còn $E_{p,c}$, $E_{p,a}$ là điện thế cực đại của catốt và anot trong Hình 1.1.

Biến thiên điện thế theo thời gian có thể xác định theo công thức:

$$\varphi = \varphi_d - v \cdot \tau \quad \text{khi } 0 < \tau < \lambda$$

$$\varphi = \varphi_d - v \cdot \lambda + v(\tau - \lambda) \quad \text{khi } \tau > \lambda$$

Trong đó:

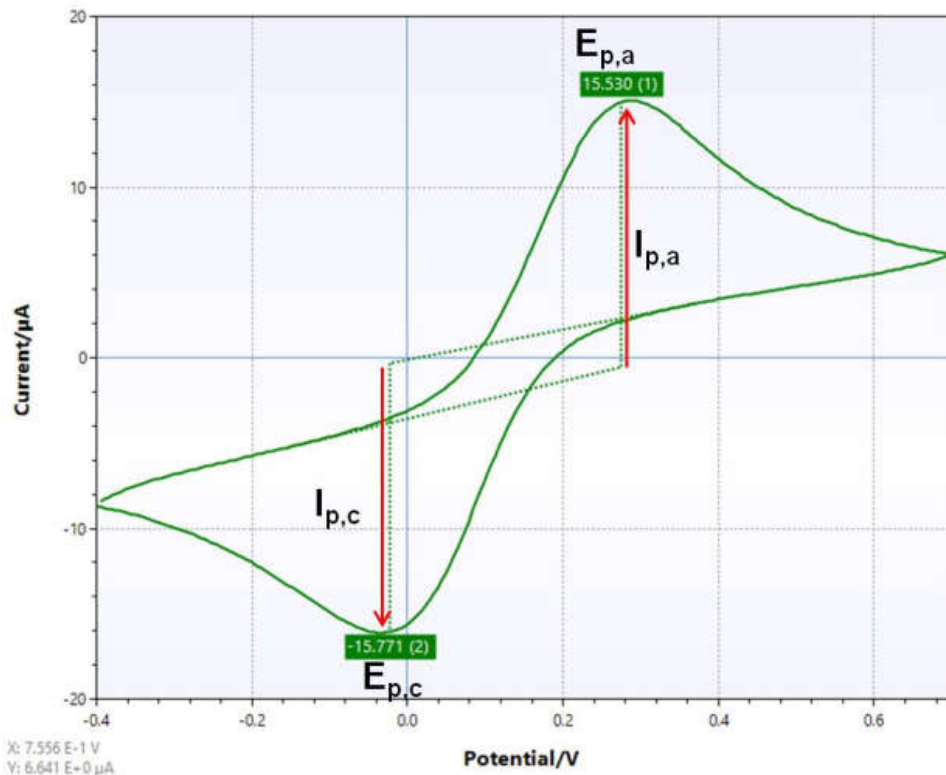
v - Tốc độ quét thế 0,000 (V/s) - 1000 (V/s)

λ - Thời điểm đổi chiều quét thế (s)

τ - Thời gian (s)

φ_d - Điện thế ban đầu (V)

Khi quét CV cho bề mặt điện cực nghiên cứu, đồ thị phụ thuộc của điện thế và dòng điện có dạng:



Hình 1.2. Quan hệ giữa điện thế và dòng điện trong quét thế vòng tuần hoàn

Đối với hệ thống thuận nghịch: Dòng điện oxy hóa khử cực đại (I_{peak}) được xác định

$$I_{peak} = -2,69.10^5 . n^{3/2} . A . D_0^{1/2} . C_0 . v^{1/2}$$

Trong đó:

n - Số điện tử trao đổi trong quá trình oxy hóa khử

(phản ứng thuận nghịch $n = 1$)

D_0 - Hệ số khuếch tán cm^2/s

C_0 - Nồng độ ban đầu của chất O, mol/cm^3

A - Diện tích điện cực cm^2

v - Tốc độ quét thế V/s

Các giá trị n , A , D_0 , C_0 không đổi, dòng cực đại I_{peak} tỷ lệ thuận với tốc độ quét thế trong quá trình đo.

Đối với hệ thống bất thuận nghịch:

Đối với phản ứng bất thuận nghịch loại: $I_{p,c} = I_{p,a}$, $O + ne \Rightarrow R$, thì đường cong Von - Ampe khi quét thế vòng không có peak ngược, dòng điện cực đại:

$$I_{pc} = -2,99.10^5 . n' [(1 - \alpha)n']^{1/2} A . D_0^{1/2} . C_0 . v^{1/2}$$

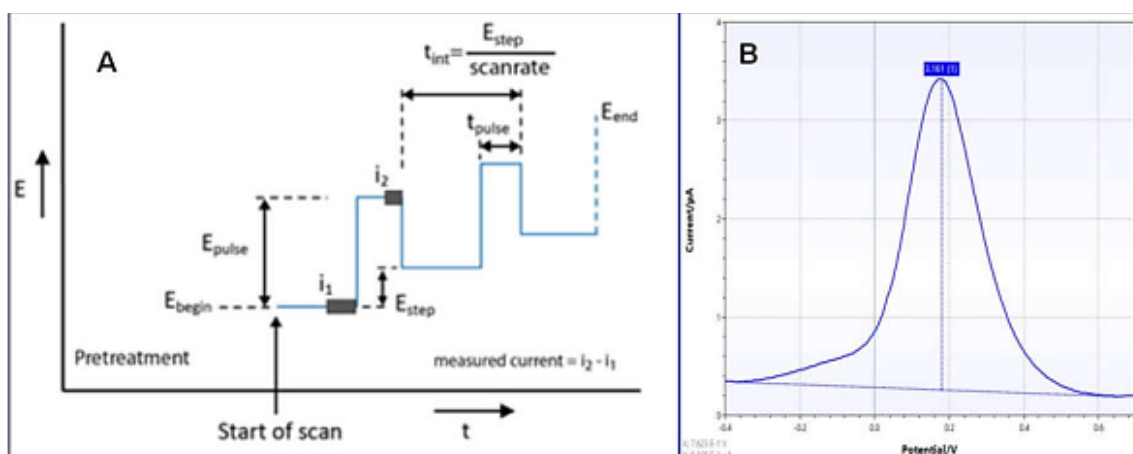
Với: A - Diện tích điện cực, cm^2 ; C_0 - Nồng độ chất oxi hóa trong dung dịch, mol/cm^3 ; n' là số điện tử trao đổi trong giai đoạn không chế.

Trong phương pháp này dòng cực đại hoàn toàn phụ thuộc vào tốc độ quét, đồng thời đường cong Von - Ampe dịch chuyển về phía có điện thế âm hơn hệ thống thuận nghịch. Phương pháp đo CV là phương pháp chính để thực hiện các phép đo điện hóa, trong đó hệ thống thuận nghịch được sử dụng chính trong ứng dụng của cảm biến miễn dịch điện hóa. Phương pháp đo CV có dòng điện đầu ra phụ thuộc chính vào tốc độ quét thế, để tăng độ nhạy của phương pháp đo thì cần hạn chế dòng tụ điện, để hạn chế điều này trong quá trình thực hiện đo CV cần lựa chọn dải đo có tốc độ quét từ 25 mV/s đến 150 mV/s [53].

1.2.3.2. Phương pháp đo Von - Ampe xung vi sai (DPV)

Phương pháp đo Von-Ampe xung vi sai được sử dụng rộng rãi trong phân tích điện hóa, do phương pháp này sử dụng các thiết bị đo khá đơn giản tuy nhiên có khả năng phát hiện với giới hạn khá thấp. Dòng điện được lấy mẫu ngay sau khi xung ứng

dụng được thiết lập, quá trình đo được lặp đi lặp lại cho một loạt xung có biên độ không đổi liên tiếp, kết quả là đường cong biểu diễn sự phụ thuộc của dòng điện vào tốc độ quét xung thế. Phương pháp này khác hoàn toàn với kỹ thuật quét thế tuyến tính và CV. Các phản ứng thuận nghịch của quá trình oxy hóa khử, bằng phương pháp chônng chất, người ta tính toán khả năng đáp ứng của dòng oxy hóa theo một chuỗi xung điện áp có biên độ không đổi đặt chônng lên điện thế một chiều (DC). Biên độ xung nằm trong khoảng 5 mV đến 50 mV [54]. Thời gian xung được xác định bằng $E_{step}/$ tốc độ quét, với phương pháp DPV dòng điện được lấy mẫu hai lần trong mỗi bước: lần 1 được thực hiện ngay trước khi áp xung và lần 2 ở cuối xung. Sự khác biệt trong hai lần áp xung được biểu diễn thành đường thế tương ứng, dòng điện thu được tỷ lệ với hàm của đường cong tuyến tính của xung thế (Hình 1.3). Do đó, DPV có đường cong hình đỉnh nhọn, chiều cao peak tỷ lệ với sự oxy hóa khử của điện cực trong dung dịch.



Hình 1.3. Biên độ thế của chu kỳ xung (A), đặc trưng đường cong Vôn-ampe (B) trong phương pháp đo DPV

E_{begin} và E_{end} là thế đầu và cuối của xung áp vào điện cực, E_{pulse} là biên độ xung, E_{step} là khoảng cách biên độ trong bước nhảy của 2 chu kỳ xung liên tiếp, t_{pulse} là chu kỳ của xung trong dải từ 1 ms đến 1 s. Trong một nghiên cứu của mình, Yongli Ye và cộng sự đã sử dụng phương pháp đo DPV để xác định và so sánh đặc trưng điện hóa của cảm biến sinh học xác định Phloretin trên cơ sở điện cực cacbon biến tính hạt nano vàng với l-cysteine. Phương pháp DPV được Yongli Ye khảo sát đặc tính điện hóa trong quá trình biến tính hạt AuNPs lên trên bề mặt điện cực GCE. Kết quả cho thấy, sự biểu diễn peak oxy hóa khử của các quá trình biến tính hạt nano vàng lên bề mặt điện cực có độ tuyến tính thay đổi theo thời gian điện hóa làm tăng cường tín hiệu điện ra theo dõi được sai lệch cỡ 5 μ A đến 10 μ A. Kết quả cũng đã minh chứng

cho thấy để xác định nhanh một đặc trưng điện hóa của cảm biến sinh học phương pháp đo DPV hoàn toàn có thể là một lựa chọn ưu tiên.

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

Việc phát triển chip vi lỏng cho các ứng dụng cảm biến điện hóa thu hút sự quan tâm đáng kể, bao gồm cả hệ thống vi lỏng dòng liên tục và vi lỏng dựa trên giọt [55]. Ở dạng cơ bản nhất, các chip này bao gồm các thành phần thiết yếu như cổng vào (inlet) để đưa mẫu, một vùng cảm biến (hoặc vùng phát hiện) nơi các phân tử phân tích được cố định hoặc tương tác, và cổng ra (outlet) để thải mẫu. Mục tiêu chính của việc tích hợp cảm biến điện hóa vào chip vi lỏng là nhằm tự động hóa các quy trình phân tích đa bước, cho phép thực hiện toàn bộ quy trình trên một thiết bị duy nhất [56]. Sự tích hợp này mang lại nhiều ưu điểm vượt trội như giảm thiểu thể tích mẫu và thuốc thử, rút ngắn thời gian phân tích, tăng độ nhạy và khả năng phát hiện, đồng thời tạo điều kiện phát triển các thiết bị di động và có khả năng phân tích thông lượng cao.

Hai lĩnh vực nghiên cứu nổi bật trong cảm biến điện hóa kết hợp vi lỏng bao gồm các hệ thống vi lỏng dựa trên kênh, nơi vùng cảm biến được bố trí bên trong các vi kênh, và các thiết bị vi lỏng dựa trên giấy (μ PADs) [57], tận dụng các đặc tính mao dẫn của sợi giấy để vận chuyển và xử lý chất lỏng [58,59]. Các thiết bị dựa trên giấy đặc biệt hứa hẹn cho các ứng dụng tại điểm chăm sóc (point-of-care testing - POCT) nhờ chi phí thấp, quy trình chế tạo đơn giản và dễ sử dụng. Trong khi đó, vi lỏng dựa trên giọt cung cấp các lợi thế như khả năng xử lý các thể tích mẫu rời rạc, giảm thiểu sự phân tán mẫu và nguy cơ nhiễm chéo, đồng thời cho phép trộn và thực hiện phản ứng nhanh chóng trong các giọt riêng biệt trước khi phát hiện điện hóa.

Nhiều nền tảng tích hợp này được hưởng lợi từ việc nhúng các điện cực hoặc dây điện cực (màng điện cực) trực tiếp vào chip vi lỏng [60]. Điều này có thể đạt được thông qua việc chế tạo các điện cực tại chỗ (in-situ) bằng các kỹ thuật lắng đọng vật liệu dẫn điện tiên tiến, ví dụ như phún xạ (sputtering) và quang khắc (photolithography) trên các vật liệu phổ biến như vàng, bạch kim hoặc carbon [61]. Một phương pháp khác là gắn các điện cực đã được chế tạo sẵn vào bên trong cấu trúc chip [62]. Việc tích hợp các điện cực rời theo cách này mang lại sự linh hoạt trong thiết kế, cho phép sử dụng một chip với nhiều loại cảm biến khác nhau. Hơn nữa, do có thể không yêu cầu các quy trình vi chế tạo phức tạp trong phòng sạch, phương pháp này có tiềm năng giảm chi phí sản xuất thiết bị tích hợp, đáp ứng nhu cầu sản xuất hàng loạt.

Đối với các mẫu phân tích phức tạp, đặc biệt là mẫu lâm sàng, các nền tảng vi lỏng còn có thể tích hợp các bước "chuẩn bị mẫu" tự động [63]. Với các mẫu chứa các mảnh vụn tế bào hoặc các thành phần gây nhiễu (ví dụ, tế bào hồng cầu), việc

thực hiện chuẩn bị mẫu là rất quan trọng để ngăn chặn các tín hiệu không đặc hiệu và đảm bảo độ chính xác của phép đo. Để giải quyết vấn đề này, các cấu trúc vi lọc có thể được tích hợp vào chip thông qua việc sử dụng các màng lọc làm từ giấy [64] hoặc các polyme như Parylene [65]. Trong trường hợp cần tách, phân loại hoặc phân lập các hạt hay tế bào cụ thể, có thể áp dụng các phương pháp dựa trên sự khuếch tán (ví dụ, H-filter) [66] hoặc lực điện dịch (dielectrophoresis - DEP) [67].

Trong quá trình tích hợp hệ vi lỏng và cảm biến điện hóa, việc kiểm soát dòng chảy cũng là một yếu tố then chốt. Dòng chất lỏng có thể được tạo ra một cách thụ động nhờ lực mao dẫn, đặc biệt trong các thiết bị dựa trên giấy [68], hoặc do thể tích của mẫu được bơm vào kênh [69], hay sự kết hợp của cả hai. Mặc dù các phương pháp vận chuyển chất lỏng thụ động thường được ưu tiên do tính đơn giản và không cần nguồn năng lượng bên ngoài, các phương pháp chủ động vẫn được sử dụng rộng rãi. Các cơ chế chủ động này bao gồm việc sử dụng bơm nhu động (peristaltic pumps) để tạo dòng chảy liên tục và có kiểm soát [70], hoặc các phương pháp đơn giản hơn như sử dụng áp lực ngón tay để đẩy chất lỏng trong các thiết bị sử dụng một lần [71].

Mặc dù sở hữu nhiều ưu điểm vượt trội, việc tích hợp cảm biến điện hóa vào hệ vi lỏng cũng đối mặt với một số thách thức đáng kể. Chúng bao gồm độ phức tạp trong quy trình chế tạo, đặc biệt là việc đảm bảo sự ổn định và ngăn ngừa nhiễm bẩn của các vi điện cực, các vấn đề liên quan đến việc hàn gắn và niêm phong chip để tránh rò rỉ, cũng như việc quản lý và loại bỏ bọt khí có thể hình thành trong các vi kênh, gây ảnh hưởng đến dòng chảy và kết quả phân tích. Hơn nữa, tại Việt Nam, lĩnh vực vi lỏng vẫn còn mới và đang trong giai đoạn phát triển, đòi hỏi sự đầu tư hơn nữa vào cơ sở hạ tầng nghiên cứu và thương mại hóa sản phẩm.

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

Khoảng hơn mười năm trở lại đây, Việt Nam mới tiếp cận công nghệ cảm biến sinh học nhưng đã đạt được những tiến bộ đáng ghi nhận. Đầu tiên là nhóm nghiên cứu cảm biến sinh học của Đại học Bách khoa Hà Nội với những bộ cảm biến để phát hiện dư lượng thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ và kim loại nặng trong môi trường [72,73]. Các chip sinh học này chủ yếu dựa trên các loại điện cực răng lược, được chức năng hóa bề mặt bằng các loại men (enzyme) có khả năng xúc tác cho các phản ứng thủy phân. Trong môi trường có dư lượng thuốc trừ sâu hoặc thuốc diệt cỏ, hoạt tính xúc tác của men sẽ bị suy giảm và sự suy giảm này tỷ lệ với nồng độ của chất gây ô nhiễm. Với sự phối hợp với Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, các nhóm nghiên cứu tại Đại học Bách khoa Hà Nội đã phát triển một số chip sinh học phát hiện vật liệu di truyền của virus cúm A [74,75], virus Herpes [76]. Những công trình nghiên cứu này được đánh giá cao thông qua số lượng trích dẫn trên các công trình công bố quốc tế. Cảm

biến dùng trong các công trình này là các điện cực rỗng lược với kích thước giới hạn phụ thuộc vào khả năng của thiết bị khắc quang có sẵn tại Việt Nam và sử dụng các kỹ thuật đo Lock-in từ Stanford Research (USA). Tại Đại học Bách khoa Hà Nội đã có bốn luận án tiến sĩ được thực hiện liên quan đến lĩnh vực cảm biến sinh học trên cơ sở điện cực, DNA hoặc kháng nguyên/kháng thể và ISFET, DNA ứng dụng phát hiện nhanh virus gây bệnh [77-80]. TS. Trần Thị Luyên và cộng sự đã chế tạo thành công bộ cảm biến DNA tích hợp với hệ vi lưu, bình phản ứng mini trên cơ sở biến tính Ppy để phát hiện vi rút Newcastle kết quả cho giới hạn phát hiện 10^2 EID 50/mL trong 60 phút [81].

Bên cạnh nhóm nghiên cứu tại Đại học Bách Khoa Hà Nội, việc chế tạo cảm biến sinh học ứng dụng trong y sinh cũng thu hút được sự quan tâm của các nhóm nghiên cứu tại các Trung tâm nghiên cứu hàng đầu trong cả nước: nhóm cảm biến sinh học của phòng thí nghiệm nano, Trường Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh với cảm biến sinh học để phát hiện nồng độ glucozơ và axit uric trong máu [82]; nhóm nghiên cứu nano y sinh của Viện Khoa học vật liệu, Viện Khoa học Việt Nam với các cảm biến enzyme xác định nhanh cholesterol trong huyết thanh [83] và cảm biến miễn dịch xác định sớm ung thư cổ tử cung [84], HIV [85], độc chất aflatoxin trong sản phẩm sữa [86]; Trung tâm Khoa học Vật liệu, Trường Đại học Tự nhiên cùng với các nhóm nghiên cứu về điện tử y sinh tại Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc Gia Hà Nội cũng đã thực hiện các nội dung nghiên cứu liên quan tới lĩnh vực cảm biến sinh học.

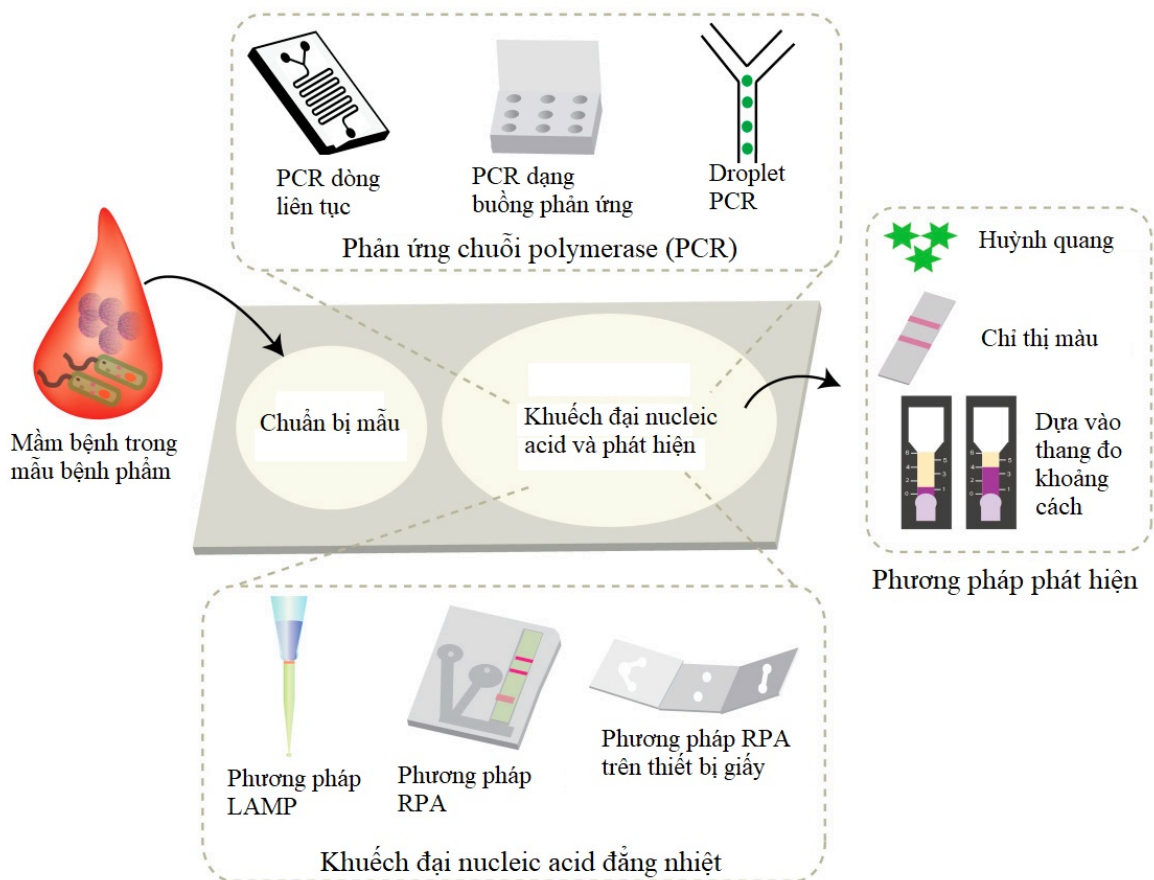
Tại Viện Khoa học và công nghệ Hàn Lâm Việt Nam, nhóm nghiên cứu nano y sinh thuộc Viện Khoa học vật liệu của GS.TS Trần Đại Lâm đã phát triển cảm biến sinh học điện hóa cho phép xác định dư lượng thuốc trừ cỏ atrazine [87], glucose [88], lactose [89], cholesterol [90], dopamine [91], DNA [92], virus [84].

Ngoài ra, nhóm của TS. Vũ Thị Thu, Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội cũng có nhiều nghiên cứu đã công bố liên quan đến chế tạo cảm biến sinh học sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như phát hiện kim loại nặng, Bisphenol A (BPA), 2, 4-dichlorophenol, dư lượng thuốc kháng sinh trong nước [93-96], theo dõi vết thương [97].

Đối với hệ vi lưu kết hợp cảm biến sinh học điện hóa, hiện chưa có nhiều công bố cũng như nghiên cứu ở Việt Nam. Gần đây có công trình của TS. Lê Nguyên Ngân, Viện Công nghệ Nano - Đại học Quốc gia TP. HCM (INT-VNUHCM) về chế tạo kênh dẫn vi lỏng bằng công nghệ in phun trên đế giấy ứng dụng trong cảm biến sinh học. Cảm biến sinh học được thiết kế để có thể dùng cho quy trình xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme (ELISA) nhằm định lượng nồng độ human chorionic gonadotropin (hCG) [98].

1.3. Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP

Kỹ thuật dựa trên khuếch đại axit nucleic là một công cụ tiềm năng trong phát hiện vi sinh vật lâm sàng nhờ tính chọn lọc cao, độ nhạy và kết quả nhanh chóng [45,99]. Nguyên lý chung của các kỹ thuật này là khuếch đại các phân đoạn cụ thể của axit nucleic. Các đoạn mỗi có thể được thiết kế để tăng tốc phản ứng khuếch đại dựa trên trình tự gen cụ thể của vi sinh vật cần kiểm tra. Nhiều phương pháp dựa trên khuếch đại axit nucleic khác nhau đã xuất hiện trong quá trình phát triển các thiết bị vi lỏng. Nhìn chung, các kỹ thuật dựa trên khuếch đại axit nucleic được chia thành *phản ứng chuỗi polymerase - PCR* và *khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt* (Hình 1.4).



Hình 1.4. Công nghệ vi lưu trong phát hiện mầm bệnh.

Kể từ khi được phát triển vào những năm 1980, PCR đã nổi lên như một công cụ mạnh mẽ để phát hiện gần như mọi vi sinh vật lâm sàng. PCR là một quá trình *in-vitro*, khuếch đại DNA bằng enzym được thực hiện ở ba nhiệt độ riêng biệt. Để thực hiện quá trình khuếch đại, PCR cần thực hiện 3 chu trình nhiệt, bao gồm biến tính DNA sợi kép ở nhiệt độ cao, ủ các đoạn mồi với trình tự bổ sung của DNA bộ gen và kéo dài với sự hỗ trợ của polymerase. Polymerase được sử dụng trong phản ứng là *Taq polymerase*, chịu được nhiệt độ cao [100]. Quá trình khuếch đại tạo ra tới một tỷ

bản sao của các gen mục tiêu ban đầu. Do những tiến bộ trong công nghệ vi lỏng, PCR đã được tích hợp vào các nền tảng vi lỏng cho các mục đích chẩn đoán.

Khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt dường như là một giải pháp thay thế đầy hứa hẹn cho PCR thông thường vì tính đơn giản và nhu cầu năng lượng thấp [101,102]. Nhiều kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt khác nhau đã được phát triển từ đầu những năm 1990. Trong phần tổng quan này, tôi tập trung vào hai kỹ thuật khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt chính: khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP) và khuếch đại polymerase tái tổ hợp (RPA).

LAMP lần đầu tiên được phát triển bởi Notomi et al. vào năm 2000, là một phương pháp mới hiện đang được dùng phổ biến để chẩn đoán nhanh trong lĩnh vực y - sinh học dựa trên khả năng tổng hợp một lượng lớn ADN mà không cần máy biến nhiệt, được thực hiện bởi một ADN polymerase đặc biệt và ít nhất hai cặp môi đặc hiệu. Bước đầu tiên của quá trình khuếch đại, bốn môi được sử dụng để tổng hợp khuôn cho phản ứng LAMP từ gen đích, sau đó hai môi được sử dụng cho mỗi chu kỳ. Toàn bộ quá trình khuếch đại đoạn ADN đích cần thời gian khoảng 40 đến 60 phút. Sản phẩm cuối cùng nhận được là các đoạn ADN kép dạng gấp khúc có kích thước gấp nhiều lần kích thước của đoạn gen cơ sở. Toàn bộ dung dịch sau phản ứng có thể quan sát được bằng mắt thường dưới sự thay đổi của các chỉ thị mà không cần điện di trên gel agarose. ADN polymerase thường được sử dụng trong các phản ứng LAMP là *Bst* ADN polymerase hoặc *Bsm* ADN polymerase có hoạt tính tự tách chuỗi cao. Do sử dụng 2-3 cặp môi bắt cặp bổ sung với 6-8 đoạn trình tự trên gen đích nên phương pháp này có độ đặc hiệu và độ nhạy rất cao, có thể thu được kết quả tốt ngay ở nồng độ AND thấp. Như vậy có thể thấy phương pháp LAMP có giới hạn phát hiện thấp hơn nhiều so với phương pháp PCR hoặc Real-time PCR nên có độ nhạy cao, cho kết quả chính xác hơn so với các phương pháp sinh học phân tử khác. Tuy nhiên, môi dùng cho phản ứng LAMP lại phức tạp hơn môi cho phản ứng PCR thông thường. Phản ứng LAMP cần phải sử dụng hai cặp môi, một cặp có chiều dài khoảng 40 nucleotit và được thiết kế đặc biệt, cặp còn lại có chiều dài khoảng 20 nucleotit.

Thêm vào đó, toàn bộ quá trình từ lúc khuếch đại gen đích và phát hiện sản phẩm phản ứng đều diễn ra trong 1 ống thí nghiệm ở điều kiện đẳng nhiệt. Ưu điểm của phương pháp này là có thể hạn chế sự nhiễm ADN ra khu vực xung quanh, điều mà phương pháp PCR không đảm bảo được do phải tiến hành điện di sản phẩm PCR và soi dưới máy UV. Như vậy, nếu sử dụng phương pháp LAMP thì không cần đến các thiết bị phòng thí nghiệm hiện đại và rất dễ dàng thao tác ở ngoài thực địa [103-107].

So với các phương pháp chẩn đoán bệnh thông thường hiện nay chủ yếu dựa vào các dấu hiệu lâm sàng, phân lập và xác định tác nhân vi sinh vật gây bệnh bằng phương pháp vi sinh và hóa sinh hoặc sử dụng các kỹ thuật miễn dịch. Kỹ thuật PCR khuếch đại axit nucleic hiện đang rất phổ biến trong các phòng thí nghiệm với ưu điểm có thể phát hiện được tác nhân gây bệnh thông qua một lượng nhỏ ADN hoặc RNA. Đây được xem là kỹ thuật chính xác và nhạy nhưng lại thường đòi hỏi nhiều thiết bị phức tạp đi kèm và kỹ thuật viên thực hiện do đó việc ứng dụng phương pháp này ngoài thực địa bị hạn chế.

Kỹ thuật LAMP có những ưu điểm mà kỹ thuật PCR không có được như:

- Không đòi hỏi máy biến nhiệt đắt tiền như trong phản ứng PCR bởi vì tất cả phản ứng diễn ra tại một nhiệt độ cố định, dao động từ 60- 65°C, tùy thuộc vào hàm lượng GC trong môi.

- Kết quả có thể được đọc ngay bằng mắt thường sau khi phản ứng kết thúc mà không cần điện di trên gel agarose.

- Thời gian thực hiện phản ứng rất ngắn, trong vòng 60 phút với giới hạn phát hiện cao hơn kỹ thuật PCR.

- Sự khuếch đại đặc hiệu cao vì có đến 2-3 cặp môi nhận biết 6-8 vùng riêng biệt trên ADN khuôn.

- Trong phương pháp LAMP lượng ADN tổng hợp được lớn hơn gấp nhiều lần so với PCR.

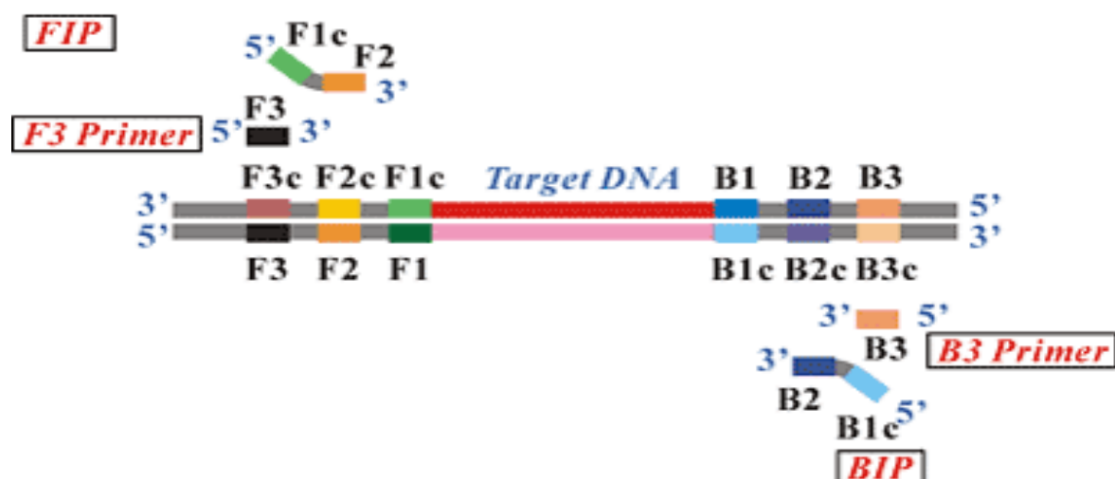
- Phương pháp LAMP có thể thực hiện khuếch đại RNA bằng cách bổ sung thêm enzyme phiên mã ngược vào trong hỗn hợp phản ứng.

1.3.1. Nguyên lý của kỹ thuật LAMP

Kỹ thuật LAMP sử dụng 4-6 môi khác nhau được thiết kế đặc biệt để nhận ra 6-8 vùng riêng biệt trên gen đích và phản ứng diễn ra ở một nhiệt độ duy nhất. LAMP chỉ xảy ra khi cả 4 chuỗi môi, bao gồm các môi F3, B3, FIP (F1c+F2), BIP (B1c+B2) bám được vào các vị trí đích của khuôn, tạo ra sản phẩm ADN-vòng. Thành phần phản ứng gồm có ADN khuôn, môi, enzyme Bst DNA polymerase, dung dịch đệm phản ứng. Quá trình tái bản gen đích chỉ diễn ra trong một bước duy nhất thường ở 55°C-65°C, hiệu quả khuếch đại cao khoảng $10^9 - 10^{10}$ bản sao trong thời gian từ 15 - 60 phút. Sản phẩm của phản ứng có thể quan sát bằng mắt thường do sự kết tủa của muối pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) dưới dạng vẩn đục màu trắng hoặc phát quang khi nhuộm bằng các chất chỉ thị màu (SYBR green). Do vậy, LAMP thường được sử dụng để tạo các bộ kit chẩn đoán nhanh [7,108].

1.3.2. Thành phần cơ bản của phản ứng LAMP

- Môi: Tối thiểu 4 môi dựa theo 6 đoạn riêng biệt trên đoạn gene quan tâm: đoạn F3c, F2c và F1c ở đầu 3' và đoạn B1, B2 và B3 ở đầu 5'. 22



Hình 1.5. Các vị trí thiết kế môi LAMP [102]

- Enzym: sử dụng phổ biến trong phản ứng LAMP là enzym Bst polymerase được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus stearotherophilus* có khả năng xúc tác tổng hợp ADN và tự tách chuỗi cao, hoạt động tối ưu ở 65°C.

- dNTPs và đệm phản ứng: tương tự như kỹ thuật PCR.

- ADN khuôn: Không đòi hỏi mức độ tinh sạch cao, có thể sử dụng các phương pháp tách ADN đơn giản, để rút ngắn thời gian chuẩn bị.

- Chất chỉ thị màu biểu hiện kết quả: Có thể sử dụng nhiều loại chất chỉ thị màu như Syber Green, Hydroxyl Naphthol Blue (HNB), Calcein, xanh malachite...

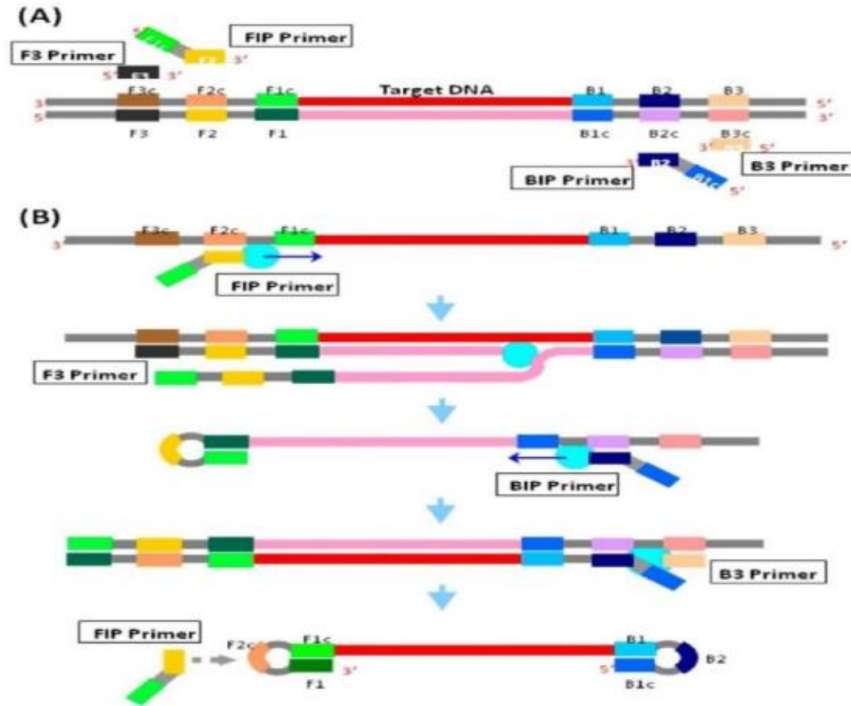
1.3.3. Cơ chế phản ứng LAMP

Gồm ba bước chính: tạo vật liệu khởi đầu, tái bản và kéo dài chuỗi, cuối cùng là lặp lại chu kỳ [102].

Bước 1. Tạo vật liệu khởi đầu:

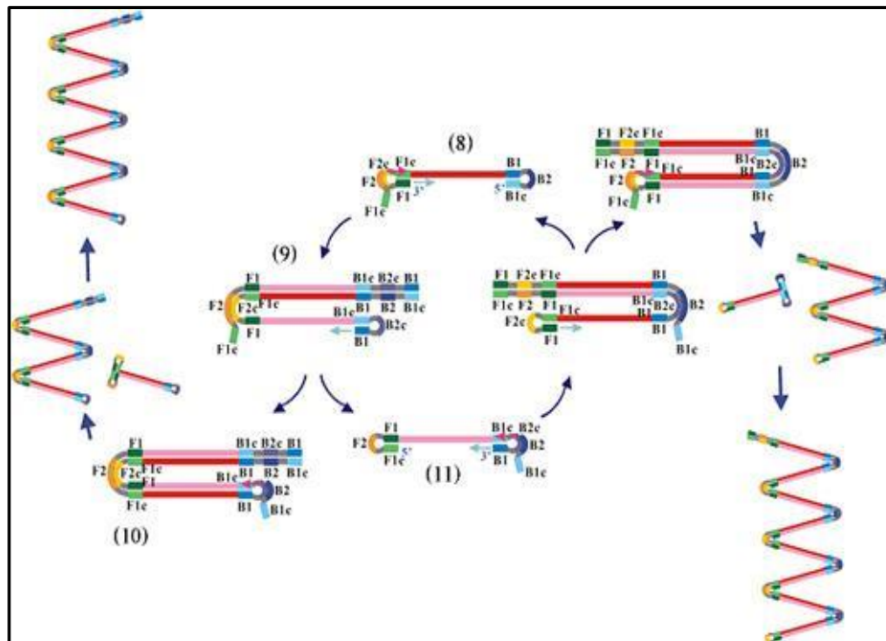
Một trong những môi LAMP sẽ bám vào trình tự ADN đích, sau đó dưới tác dụng của enzyme Bst polymerase tách sợi và kéo dài sợi mới theo chiều 3'-5' do cấu trúc bổ sung của môi với các đoạn trình tự đích trong quá trình kéo

dài sợi tạo ra sản phẩm ADN đơn có giới hạn bởi 2 môi là FIP và BIP. Sợi ADN này 2 đầu cuộn lại hình thành cấu trúc gốc vòng (stem-loop) là 23 cấu trúc khởi đầu cho quá trình tái bản của phương pháp LAMP (chu kỳ lặp lại LAMP).



Hình 1.6. Sơ đồ phản ứng tạo vật liệu khởi đầu [102]

Bước 2. Chu kỳ tái bản và kéo dài chuỗi:



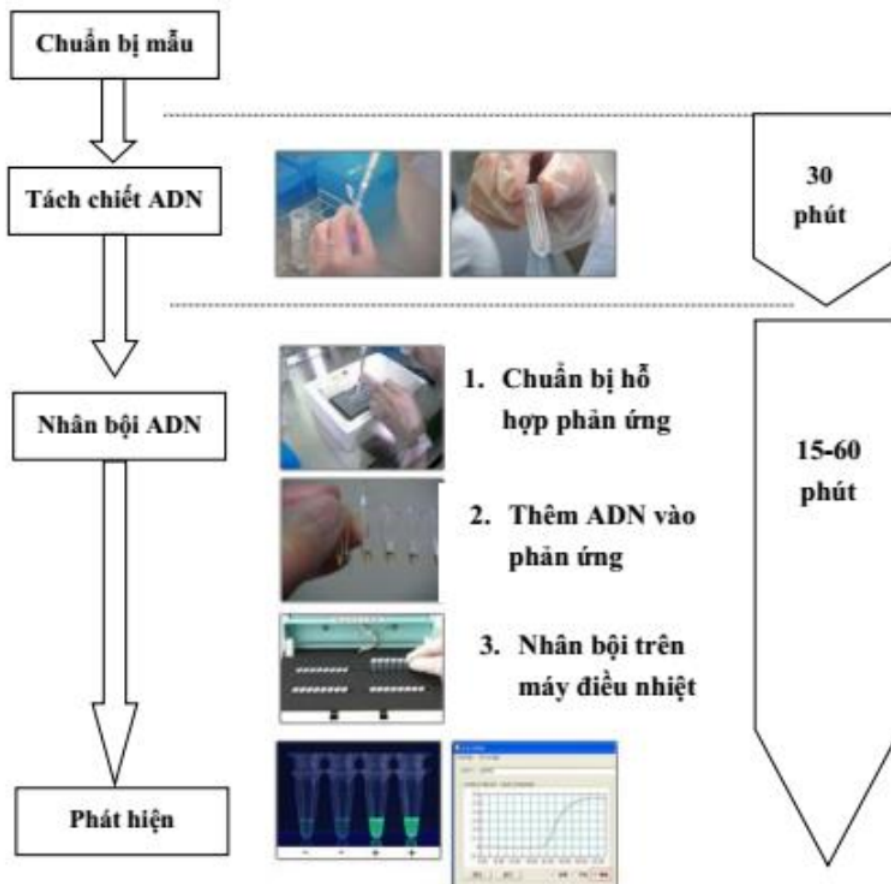
Hình 1.7. Tái bản và kéo dài chuỗi ADN [102]

Mỗi FIP liên kết với vòng trong cấu trúc ADN gốc vòng (stem-loop DNA) ở vùng F2/F2c và tổng hợp sợi ADN thay thế, đồng thời do cấu trúc vòng ở đầu 3' (do trình tự FIP tạo thành) sẽ được kéo dài và hình thành cấu trúc vòng ở vị trí kết thúc của trình tự BIP. Cấu trúc vòng của trình tự BIP lại được kéo dài hình thành nên cấu trúc sợi kép được gấp khúc ở giữa và một sợi đơn có cấu trúc vòng ở hai đầu. Hai sản phẩm này sẽ là ADN khuôn cho mỗi BIP trong các chu kỳ tái bản tiếp theo. Cuối cùng tạo ra hỗn hợp ADN gốc vòng với cấu trúc gấp khúc và độ dài khác nhau của cùng một trình tự.

Bước 3. Lặp lại chu kỳ:

Cứ như vậy, các môi FIP và BIP của cả hai sợi khuôn thay phiên nhau tổng hợp ADN bổ sung và tạo gốc vòng ở cuối mỗi sợi. Phản ứng tiếp tục, tạo nên 109- 1010 bản sao ADN mạch trong vòng 15 phút đến 1 giờ.

Các bước tiến hành phản ứng LAMP: Lấy mẫu, tách ADN/ARN, khuếch đại đẳng nhiệt và phát hiện sản phẩm.



Hình 1.8. Các bước tiến hành kỹ thuật LAMP (nguồn Eiken GENOME SITE có Việt hóa) [104]

1.3.4. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật LAMP

1.3.4.1. Ưu điểm của kỹ thuật LAMP

- Không đòi hỏi các thiết bị đắt tiền (bể ổn nhiệt, hoặc thiết bị gia nhiệt có thể giữ nhiệt độ ổn định ở 55°C-65°C)
- Độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương phương pháp phát hiện ADN khác như PCR
- Thời gian xét nghiệm nhanh (15-60 phút)
- ADN làm khuôn không đòi hỏi độ tinh sạch cao
- Phản ứng xảy ra ở điều kiện đẳng nhiệt
- Phát hiện sản phẩm trực tiếp bằng các chất chỉ thị màu

1.3.4.2. Nhược điểm của kỹ thuật LAMP so với phương pháp hình thái học và ELISA

- Đây là kỹ thuật sinh học phân tử vì vậy việc chuẩn bị mẫu vẫn phải bao gồm bước tách chiết ADN nên vẫn cần hóa chất, thiết bị cơ bản như máy ly tâm, micropipette để thực hiện.
- Do có độ nhạy cao, nên dễ tạp nhiễm, gây hiện tượng dương tính giả.
- Giá thành cao hơn so với phương pháp hình thái học và ELISA.

Ở Việt Nam, kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt đã được ứng dụng chẩn đoán một số sinh vật gây bệnh cho vật nuôi và cây trồng như phát triển kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7 [8], chẩn đoán bệnh đốm trắng ở tôm, bệnh Phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên sắn, chẩn đoán bệnh vàng lá trên cây có múi. Kỹ thuật RT-LAMP chẩn đoán virus gây bệnh rối loạn sinh sản hô hấp trên heo. Trong lĩnh vực y tế một số ứng dụng như RT-LAMP chẩn đoán virus dại, virus viêm não Nhật Bản, virus Dengue. Một số sản phẩm đã phát triển thành các bộ kit và thương mại hóa trên thị trường như Bộ Kit LAMP chẩn đoán bệnh virus trên tôm - STN15067 của Trung tâm công nghệ sinh học Hồ Chí Minh, kit nhanh RT-LAMP chẩn đoán virus Dengue của Viện công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội...

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

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt theo khuôn vòng (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP) là một phương pháp khuếch đại axit nucleic có độ nhạy và độ

đặc hiệu cao. Một trong những ưu điểm lớn nhất của việc tích hợp LAMP vào các thiết bị vi lỏng là loại bỏ sự cần thiết của máy chu trình nhiệt (thermal cycler), do đó, LAMP đã được ứng dụng rộng rãi để phát triển các thiết bị vi lỏng nhằm phát hiện các tác nhân gây bệnh trong lâm sàng.

Nhiều nền tảng vi lỏng đã được đề xuất để tích hợp toàn bộ quy trình từ xử lý mẫu đến phát hiện. Ví dụ, một hệ thống tích hợp quy trình chiết xuất DNA dựa trên hạt từ (magnetic beads) đã được phát triển để sàng lọc gen *mecA* từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin (MRSA) trong các mẫu lâm sàng phức tạp như đờm và huyết thanh [110]. Sau khi tinh sạch DNA mục tiêu bằng các hạt từ được liên hợp với đầu dò đặc hiệu, DNA được khuếch đại bằng phương pháp LAMP, đạt giới hạn phát hiện (LOD) là 10 fg/ μ L.

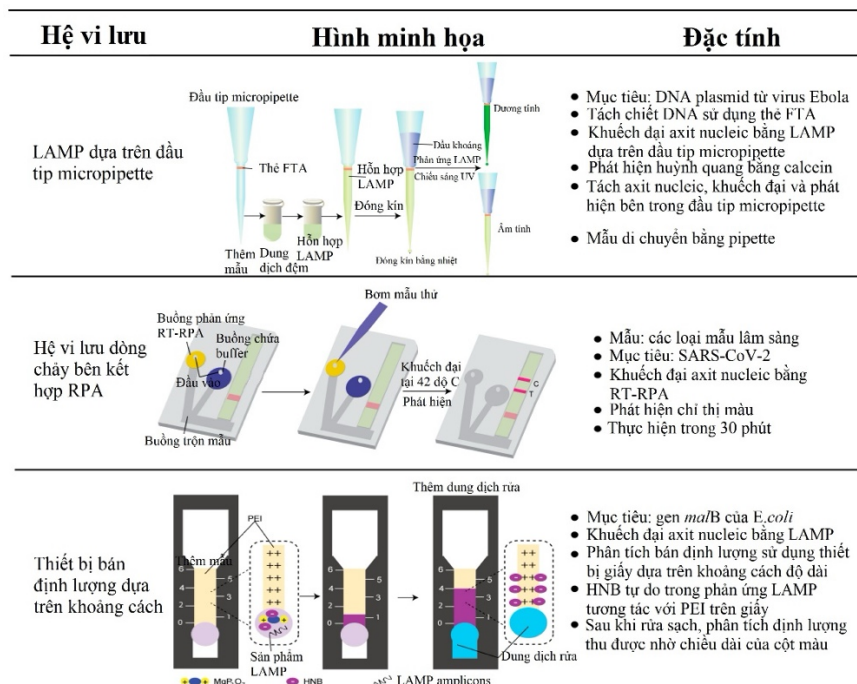
Một cách tiếp cận khác là việc phát triển nền tảng phân tích axit nucleic tích hợp hoàn toàn trong đầu tip của micropipette, hiện thực hóa một hệ thống "mẫu vào - kết quả ra" (sample-in-answer-out) để phát hiện DNA và RNA trực tiếp từ mẫu thô. Hệ thống này tích hợp thẻ FTA để chiết xuất axit nucleic pha rắn, phản ứng khuếch đại LAMP, và phát hiện tín hiệu huỳnh quang bằng thuốc nhuộm calcein. Toàn bộ quy trình, từ chiết xuất axit nucleic trong 30 phút đến khuếch đại các đoạn gen của virus Ebola trong 45 phút, đều được thực hiện bên trong đầu tip. Kết quả dương tính được xác định trực quan bằng mắt thường dưới ánh sáng đèn UV cầm tay. Phương pháp này cũng đã được chứng minh hiệu quả trong việc sàng lọc mRNA của cytokeratin-19, một chỉ dấu sinh học của bệnh ung thư [111].

Các nhà khoa học cũng đã giới thiệu những giải pháp sáng tạo cho các ứng dụng tại điểm chăm sóc (point-of-care) ở những khu vực có nguồn lực hạn chế. Một hệ thống chẩn đoán HIV-1 RNA đã được phát triển, có khả năng cho kết quả trong vòng 80 phút mà không cần nguồn điện bên ngoài; nhiệt cho phản ứng phiên mã ngược-LAMP (RT-LAMP) được cung cấp bởi một phản ứng tỏa nhiệt. Việc kết hợp RT-LAMP với phương pháp phát hiện dựa trên que thử dòng chảy ngang (lateral flow assay) đã tạo ra một giải pháp chẩn đoán phân tử mạnh mẽ, không đòi hỏi thiết bị phức tạp hay nguồn điện công suất cao [112].

Một nghiên cứu khác đã tích hợp RT-LAMP với que thử thai thương mại để tạo ra một công cụ chẩn đoán nhanh, nhạy và hiệu quả về chi phí cho virus SARS-CoV-2 [113]. Nguyên lý phát hiện dựa trên sự tương tác giữa sản phẩm khuếch đại (amplicon) của RT-LAMP và đầu dò human chorionic gonadotropin (hCG) được nạp sẵn trong thiết bị. Trong mẫu dương tính, một lượng lớn amplicon được tạo ra sẽ lai với đầu dò hCG, hình thành các phức hợp lớn không thể di chuyển trên dải giấy của

que thử; do đó, chỉ có vạch chứng (control line) xuất hiện, cho thấy kết quả dương tính. Ngược lại, trong mẫu âm tính, không có amplicon, các đầu dò hCG tự do di chuyển và tạo ra cả vạch chứng và vạch thử (test line). Hệ thống này cung cấp một giải pháp đầy hứa hẹn cho việc phát hiện khẩn cấp SARS-CoV-2.

Ngoài các phương pháp định tính, LAMP còn được tích hợp vào các hệ thống định lượng. Một thiết bị vi lỏng cho LAMP kỹ thuật số (digital LAMP) đã được đề xuất để định lượng *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE) [114]. Hệ thống này tạo ra các giọt nhũ tương nước-trong-dầu có kích thước đồng nhất, nơi phản ứng LAMP khuếch đại gen *vana* diễn ra trong từng giọt riêng lẻ. Phương pháp này cho phép khuếch đại DNA của VRE trong 30 phút với giới hạn phát hiện thấp tới 11 bản sao/phản ứng. Để cho phép diễn giải bán định lượng một cách đơn giản, một hệ thống kết hợp LAMP và thiết bị phân tích trên giấy dựa trên khoảng cách (distance-based paper device) đã được đề xuất để khuếch đại gen *malB* của *E. coli* [115]. Thiết bị giấy được xử lý bằng một polyme cation là polyethylenimine (PEI), và thuốc nhuộm hydroxyl naphthol blue (HNB) được sử dụng làm chất chỉ thị màu. Sau phản ứng LAMP, hỗn hợp phản ứng được nhỏ lên thiết bị giấy. Các ion HNB tự do (không tham gia vào phản ứng khuếch đại) sẽ tương tác với PEI, tạo ra một vạch màu xanh lam có chiều dài tương quan nghịch với nồng độ DNA ban đầu trong mẫu. Thiết bị này cho phép xác định bán định lượng axit nucleic của mầm bệnh một cách đơn giản, chi phí thấp, dùng một lần và có tính di động cao.



Hình 1.9. Ví dụ về các thiết bị vi lỏng được sử dụng khuếch đại axit nucleic đẳng nhiệt để phát hiện mầm bệnh [111,116,117].

Một số khía cạnh quan trọng của thiết bị vi lỏng cần được xem xét bao gồm loại mẫu được sử dụng, phương pháp chiết / khuếch đại / phát hiện, thời gian phân tích và độ nhạy, ở một số khía cạnh nhất định, được tóm tắt trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Đặc điểm của một số thiết bị vi lỏng dựa trên khuếch đại axit nucleic.

Thiết bị vi lỏng	Loại mẫu	Tách chiết	Loại khuếch đại	Phát hiện	Thời gian hoạt động	Độ nhạy	Tham khảo
Thiết bị vi mô chẩn đoán phân tử <i>all-in-one</i> có thể gập lại được	Mẫu lâm sàng	Thẻ FTA	PCR sử dụng buồng phản ứng	Chỉ thị màu	Trong vòng 2 giờ	3.0×10^2 đối với vi khuẩn Gram âm và 3.0×10^3 CFU đối với vi khuẩn Gram dương	[118]
Hệ thống khuếch đại nucleic và vi lỏng tích hợp	Nước bọt	Tập trung virus bằng các hạt nano từ tính kết hợp kháng thể	RT-PCR sử dụng buồng phản ứng	Điện di trên gel	Trong vòng 2 giờ	100 TCID50 (50% liều lây nhiễm nuôi cấy mô) trong nước bọt	[119]
Thiết bị vi lưu tích	Dịch dưới lợi	Chuẩn bị mẫu	PCR dòng liên tục	Điện di mao	Khuếch đại DNA	125 CFU / μL	[120]

hộp <i>all-in-one</i>		ngoài chip		quản trên chip	trong 2'31' và phát hiện trong 3'43''		
Hệ thống qRT-PCR dòng liên tục, vi lưu, để phát hiện RNA virus	Gen L của virus Ebola	Chuẩn bị mẫu ngoài chip	RT-PCR dòng liên tục	Phát hiện huỳnh quang	30–50 phút	10 bản sao RNA trên mỗi microlit	[121]
Xét nghiệm axit nucleic dựa trên đầu micro-pipette	Tế bào vi khuẩn nuôi cấy	Thẻ FTA	LAMP	Phát hiện huỳnh quang	90-160 phút	2 bản sao của plasmid chứa gen virus Ebola; 8 CFU của <i>Escherichia coli</i> mang plasmid có nguồn gốc từ virus Ebola	[111]
Chẩn đoán SARS-CoV-2 dựa	Gen N của gen M SARSCoV-2 và trình tự một	Chuẩn bị mẫu ngoài chip	RT-LAMP	Que thử thai	Trong vòng 2 giờ	0,5 bản sao / μ L	[113]

trên que thử thai thương mại	phần của gen N của SARS-CoV						
--	-----------------------------------	--	--	--	--	--	--

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:

Thứ nhất, việc lựa chọn, thiết kế và chế tạo hệ điện cực đóng vai trò then chốt quyết định đến độ nhạy, chi phí phân tích và khả năng tương thích với các quy trình cố định sinh học. Các vật liệu điện cực thường được nghiên cứu bao gồm kim loại quý (Pt, Au) và các dạng carbon biến tính (sợi carbon, graphit epoxy, graphene, carbon thủy tinh). Sự lựa chọn vật liệu và công nghệ chế tạo phụ thuộc nhiều vào năng lực chuyên môn và điều kiện cơ sở vật chất của phòng thí nghiệm, đặc biệt là các cơ sở sản xuất trong phòng sạch.

Thứ hai, xu hướng nghiên cứu tích hợp hệ vi lưu và vi buồng phản ứng với cảm biến điện hóa đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học quốc tế. Hướng nghiên cứu này hướng đến mục tiêu thu nhỏ hệ thống phân tích, giảm thiểu lượng mẫu tiêu thụ và nâng cao tỷ lệ tín hiệu/nhiều của phép đo. Sự kết hợp giữa cảm biến điện hóa và công nghệ vi lưu được xem như nền tảng để phát triển các thiết bị phân tích điện hóa di động, đáp ứng yêu cầu phân tích tại hiện trường. Tuy nhiên, lĩnh vực nghiên cứu này vẫn còn khá mới mẻ tại Việt Nam.

Thứ ba, việc nghiên cứu phát triển các quy trình đo lường điện hóa chuyên biệt cho phát hiện các thành phần sinh học đặc hiệu là một hướng đi quan trọng. Nghiên cứu này tập trung vào việc thiết kế các phương pháp đo tối ưu để phát hiện phân tử đích trong mẫu phân tích phức tạp, từ đó làm cơ sở cho việc chế tạo các thiết bị điện hóa chuyên dụng phục vụ phân tích.

Để giải quyết đồng bộ các vấn đề nêu trên, đòi hỏi phải có sự hợp tác liên ngành sâu rộng giữa các lĩnh vực hóa học, vật lý, điện tử, sinh học và khoa học vật liệu. Trên thế giới, mô hình nghiên cứu liên ngành đang trở thành xu thế chủ đạo trong việc phát triển và chế tạo thành công các hệ thống tích hợp giữa thiết bị đo điện hóa và hệ thống vi lưu.

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

Để có thể chăm sóc người bệnh và kiểm soát bệnh truyền nhiễm một cách tốt nhất, các xét nghiệm chẩn đoán tại chỗ chính xác đóng một vai trò quan trọng. Để đạt được điều này, lý tưởng nhất là sử dụng một thiết bị sinh học cầm tay đa năng, thực hiện cả việc xử lý mẫu, phân tích mẫu và đọc kết quả.

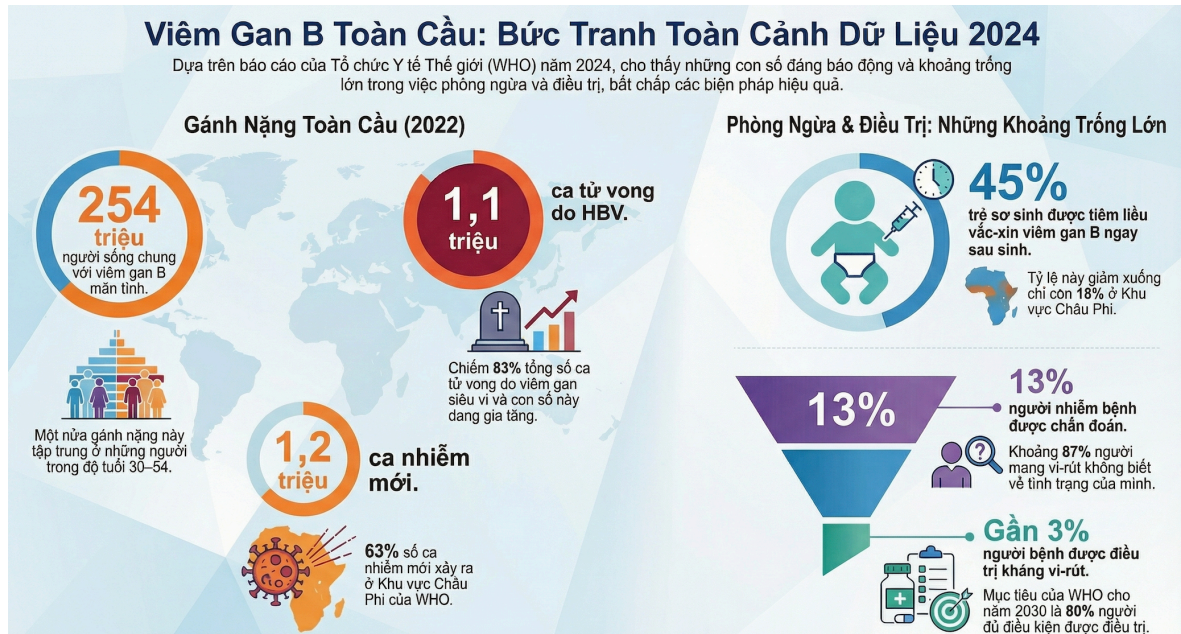
Trong nội dung nghiên cứu này, luận án sẽ hướng đến việc nghiên cứu, chế tạo một thiết bị vi lưu tích hợp để phát hiện mầm bệnh bằng cách theo dõi sự biến đổi điện hóa của dung dịch chứa mẫu thử theo thời gian thực trong quá trình khuếch đại axit nucleic. Phương pháp khuếch đại sử dụng là phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP. Sự xen kẽ và gắn kết giữa các phân tử đầu dò oxy hóa khử tự do và DNA sản phẩm của quá trình khuếch đại trong dung dịch pha lỏng dẫn đến sự thay đổi các giá trị điện hoá của dung dịch thử ban đầu.

Sử dụng các phép đo điện hoá, cụ thể trong phần này NCS sử dụng kỹ thuật đo von-ampe sóng vuông (square wave voltammetry - SWV) để ghi nhận sự thay đổi giá trị điện thế trong dung dịch ban đầu. Mỗi liên hệ giữa sự thay đổi điện hoá của dung dịch trước và sau khi thực hiện phản ứng khuếch đại DNA được sử dụng để có thể đưa ra nhận định mẫu cần chẩn đoán có chứa mầm bệnh hay không. Toàn bộ quá trình kể trên được hoàn thành trong vòng 70 phút.

Thiết bị proof-of-concept trên cơ sở hệ vi lưu tích hợp mà NCS xây dựng có khả năng cung cấp một công cụ nhanh chóng và dễ dàng để định lượng mầm bệnh, virus trong thời gian ngắn và hạn chế rủi ro tiềm ẩn của việc lây nhiễm chéo. Những công cụ chẩn đoán như vậy có khả năng tạo ra sự khác biệt to lớn cho cuộc sống của hàng triệu người trên toàn thế giới.

Mầm bệnh mục tiêu cần phát hiện trong nghiên cứu này là virus viêm gan B (HBV), một mối đe dọa sức khỏe cộng đồng lâu dài trên toàn thế giới. Nhiễm Viêm gan B (HBV) làm tăng nguy cơ phát triển thành ung thư biểu mô tế bào gan 100 lần. Khoảng 80% các trường hợp mắc ung thư biểu mô tế bào gan trên thế giới và 70% ở Việt Nam là do HBV gây ra. Mỗi năm có khoảng 0,5% những người nhiễm virus viêm gan B mãn tính sẽ phát triển thành ung thư gan (HCC). Tại Việt Nam, có khoảng 8 triệu người nhiễm viêm gan B mãn tính. Trong năm 2017, số người bị xơ gan là hơn 51.000 người, hơn 14.000 người ung thư tế bào gan và hơn 32.000 người tử vong.

Việc theo dõi và giám sát các mầm bệnh truyền nhiễm như vậy ở người ngày càng trở nên quan trọng đối với chẩn đoán lâm sàng. Trong vài thập kỷ qua, những tiến bộ lâm sàng đã mang lại những con đường để phát hiện, quản lý và kiểm soát thành công các bệnh truyền nhiễm như vậy.



Hình 2.1. Tình hình nhiễm virus HBV trên thế giới

Hiện nay, việc sàng lọc và chẩn đoán định kỳ chủ yếu dựa trên phát hiện miễn dịch kháng nguyên bề mặt HBV (HBsAg) hoặc kháng thể (anti-HBc, anti-HBs) trong huyết thanh hoặc huyết tương bằng cách sử dụng xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA) hoặc điện hóa phát quang (ECL). Gần đây, các phương pháp chẩn đoán phân tử như phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và PCR thời gian thực đã được phát triển để phát hiện mầm bệnh trong thời gian ngắn hơn với độ nhạy và độ đặc hiệu được cải thiện đáng kể. Một số thử nghiệm sử dụng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt, chẳng hạn như khuếch đại đẳng nhiệt vòng trung gian (LAMP), khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic (NASBA) và kỹ thuật khuếch đại xoay vòng (RCA) đã được dùng để chẩn đoán HBV. Tuy nhiên, quy trình tốn kém của các phương pháp chẩn đoán huyết thanh hiện tại và chi phí trang thiết bị cần thiết cao vẫn là những vấn đề lớn đối với việc sàng lọc viêm gan. Ngoài ra, việc lấy mẫu qua tĩnh mạch vốn tương đối đơn giản cũng sẽ trở nên khó khăn trong một số trường hợp cụ thể, chẳng hạn như các quốc gia có tỷ lệ người mắc bệnh cao với khả năng tiếp cận thiết bị xét nghiệm hạn chế. Do đó, điều cực kỳ quan trọng là phải phát triển các công nghệ chẩn đoán tại chỗ dễ sử dụng, nhanh chóng và chính xác cao để ứng dụng trong xét nghiệm lâm sàng càng sớm càng tốt. Về vấn đề này, một số kỹ thuật chẩn đoán thông thường đã được điều chỉnh cho phù hợp với hệ thống lab-on-chip (LOC) để theo dõi nhanh

tại chỗ các virus mầm bệnh. Đã có rất nhiều nghiên cứu liên quan đến phân tích mầm bệnh trên chip sinh học được công bố trong thời gian gần đây, như phần Tổng quan tôi đã trình bày. Thiết bị tích hợp xét nghiệm miễn dịch hoặc phân tích gen đã được phát triển và chứng minh là có hiệu quả trong chẩn đoán virus mầm bệnh.

Trong thời gian tìm hiểu và nghiên cứu phát triển thử nghiệm thiết bị chẩn đoán tại chỗ để phát hiện chỉ dấu sinh học, tôi nhận thấy phương pháp khuếch đại phù hợp nhất hiện nay để mang lên thiết bị tích hợp hay chip sinh học là LAMP. Kỹ thuật này có thể đạt được độ chính xác tương đối cao trên cấu hình chip rất đơn giản với quy trình vận hành dễ dàng. Kể từ khi phát minh ra LAMP vào năm 2000, một số nghiên cứu đã báo cáo việc triển khai nó trên chip sinh học với các phương pháp phát hiện khác nhau [103-106].

Thông thường, bằng cách sử dụng máy đo độ đục hoặc quan sát tương đối bằng mắt thường ta có thể thực hiện việc giám sát sản phẩm khuếch đại, còn gọi là amplicon, LAMP dựa vào việc phản ứng khuếch đại giải phóng kết tủa magie pyrophosphat. Thuốc nhuộm (xanh SYBR, SYTO 9, SYTO 82) thường được thêm vào dung dịch phản ứng để có khả năng hiển thị tốt hơn. Các cơ chế phát hiện khác như điện di hoặc phát hiện sắc ký cũng đã được nghiên cứu để phát hiện amplicon trong biochip dựa trên phản ứng LAMP. Mặc dù các phương pháp như vậy có thể tránh được sự ức chế khuếch đại bởi các thuốc thử bổ sung, nhưng các tín hiệu dương tính giả vẫn có thể xảy ra. Ngược lại, như đã trình bày, các phương pháp điện hóa nhận được sự chú ý đặc biệt, do các ưu điểm khác biệt của chúng về tốc độ và độ nhạy cao, chi phí thấp và tính di động.

Trong hầu hết các hệ thống cảm biến DNA, phép lai giữa DNA mục tiêu trong dung dịch và DNA đầu dò được cố định trên điện cực được sử dụng để theo dõi một amplicon của DNA. Theo cách tiếp cận như vậy, các hợp chất có hoạt tính oxy hóa khử tương tác với cả DNA kép và DNA đơn, có thể tạo ra kết quả gây nhầm lẫn. Để giải quyết những hạn chế đó, phương pháp phát hiện DNA bằng điện hóa pha lỏng gần đây đã bắt đầu được phát triển. Trong cách tiếp cận mới này, sự tương tác giữa chất trung gian oxy hóa khử ổn định về mặt hóa học và DNA khuếch đại được sử dụng để đếm số lượng amplicon mà không cần cố định đầu dò DNA trên điện cực.

Từ những lý do ở trên, NCS đã phát triển một thiết bị vi lưu tích hợp cảm biến sinh học điện hóa pha lỏng, phương pháp khuếch đại LAMP để phát hiện và theo dõi định lượng virus HBV theo thời gian thực. Hệ thống *proof-of-concept* này minh chứng việc một hệ thống vi lỏng có thể đo, đếm sản phẩm khuếch đại DNA liên tục. Việc phát hiện các sản phẩm LAMP theo thời gian thực được thực hiện bằng cách sử

dụng xanh methylen làm đầu dò oxy hóa khử, giúp định lượng chính xác HBV có trong mẫu. Không cần thêm quy trình để xử lý bề mặt điện cực. Chip sinh học được phát triển phù hợp để phát hiện nhanh chóng tại chỗ các mầm bệnh trong các mẫu lâm sàng cũng như các mầm bệnh từ thực phẩm và chất gây ô nhiễm nước.

2.1.2. Vật liệu và phương pháp

2.1.2.1. Vật liệu, hóa chất

Methylene blue (MB) được đặt mua từ Merck (Đức). Dung dịch MB 260 μM được chuẩn bị với dung môi là nước và giữ ở 4°C, cất trong bóng tối. Dung dịch muối đệm phosphate (PBS) được mua từ SigmaAldrich (Mỹ). Tất cả các hóa chất đều thuộc loại tinh khiết cho phân tích. Các dung dịch được chuẩn bị và pha loãng bằng nước siêu tinh khiết (18,3 M Ω). Hóa chất phản ứng khuếch đại LAMP (Bộ khuếch đại DNA Loopamp) là nhận từ Công ty TNHH Eiken, Nhật Bản. Polydimethylsiloxane (PDMS) sử dụng làm vật liệu được mua từ Dow Corning Co., Ltd., USA. Cảm biến điện hóa với thiết lập ba điện cực (AC1.RS1) được mua từ BVT, Cộng hòa Séc.

2.1.2.2. Chuẩn bị mẫu thực hiện phản ứng LAMP

Các mẫu bệnh phẩm (mẫu máu) được thu thập từ những bệnh nhân nội trú nghi ngờ nhiễm virus HBV nhập viện Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương vào tháng 8 năm 2015. Tất cả các mẫu đã được xét nghiệm trước đó tại bệnh viện để rút ra kết luận ban đầu 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.

Một bộ sáu môi được thiết kế nhắm đến các đoạn mục tiêu cụ thể của virus HBV xuất hiện trong mẫu máu bệnh nhân. Bộ môi bao gồm hai môi ngoài (F3, B3), hai môi trong (FIP, BIP) và hai môi vòng (LF, LB). Tất cả các môi đều được Macrogen (Seoul, Hàn Quốc) tổng hợp thương mại.

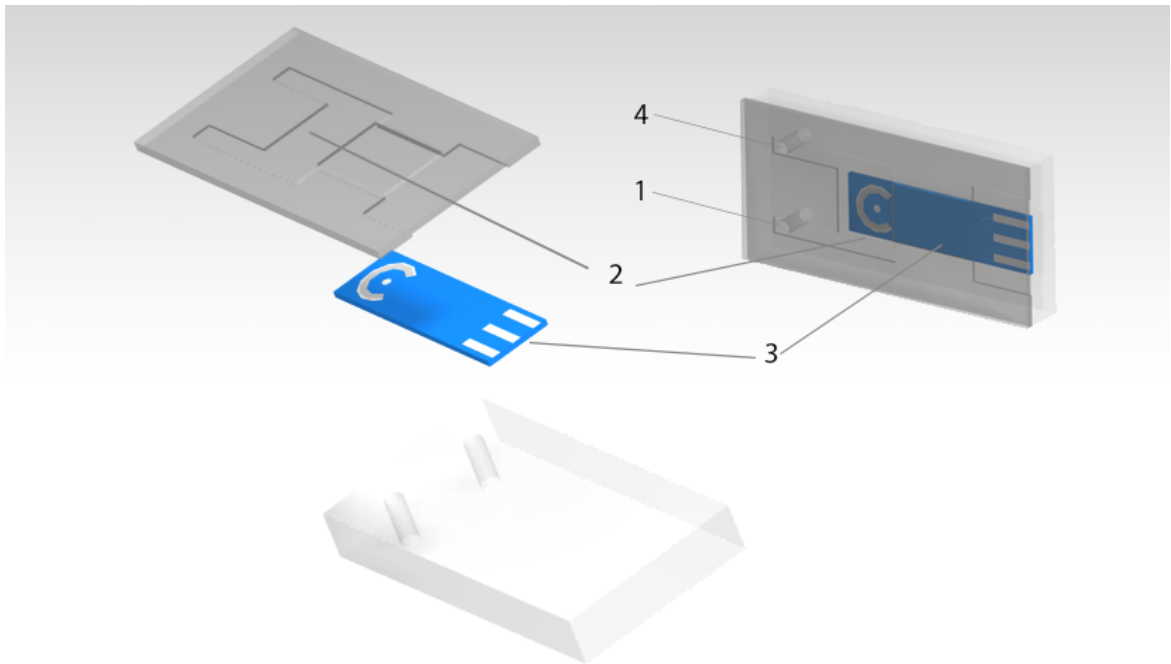
Bảng 2.1. Danh sách trình tự các primer thiết kế cho LAMP

F3	TCAACCCCATCAAGGACCA
B3	GCCTGAGGATGACTGTCTCT
FIP	CCAAAACACCGCCGTGTGGAAGCCAACCAGGTAGGAGTG
BIP	CAGGCTCAGGGCATGTTGACCTAGGCTGCCTTCCTGACT

LF	AACCCTGGCCCGAATGCTC
LB	GTCAACAATTCCTCCTCCTGCC

2.1.2.3. 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. Thẻ tích của buồng phản ứng hình chữ nhật là 20 μl (Hình 2.2).



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

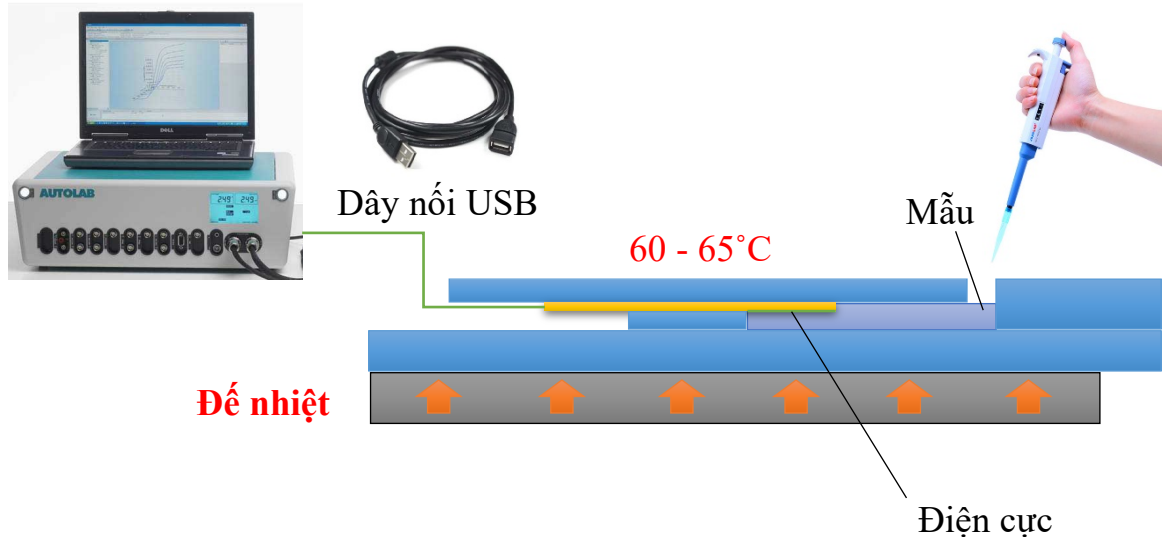
Thí nghiệm sử dụng cảm biến điện hóa hệ 3 điện cực. Đường kính của điện cực làm việc là 0.5 mm và kích thước toàn bộ chip đo được là 1 cm \times 3 cm. Thiết bị được chế tạo ở dạng trượt bằng kỹ thuật đổ khuôn. Đầu tiên, một khuôn với các phần xác định (đầu vào, đầu ra, buồng phản ứng và khe để cảm biến điện hóa) được tạo ra trên đế thủy tinh bằng cách sử dụng băng keo. Sau đó, polydimethylsiloxan (PDMS) được đổ lên khuôn. Cảm biến được gắn vào nắp PDMS bằng cách sử dụng PDMS lỏng làm chất tự dính. Cuối cùng, cảm biến được nối trực tiếp đến Potentiostat Autolab Metrohm bằng cách sử dụng dây nối USB 2.0 (chuẩn universal serial bus).

2.1.3. Nội dung nghiên cứu

2.1.3.1. Thí nghiệm

LAMP primer được thiết kế để có nhiệt độ biến tính nằm trong khoảng từ 60°C đến 65°C, do đó làm tăng hiệu quả của xét nghiệm LAMP. Chính vì vậy, nhiệt độ là một thông số được kiểm soát khi thực hiện xét nghiệm LAMP trên chip sinh học này.

Về cơ bản, ta cần duy trì nhiệt độ bên trong buồng phản ứng từ 60°C đến 65°C để quá trình khuếch đại DNA có thể diễn ra. Nhiệt độ bên trong buồng phản ứng luôn thấp hơn nhiệt độ trên bề mặt nên ta cần một nguồn nóng được đặt ở nhiệt độ 80°C ngay bên dưới chip giúp cung cấp đủ lượng nhiệt độ tối ưu cho các phản ứng LAMP.



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

Kiểm soát nhiệt độ cho phản ứng LAMP trên chip

Bộ môi LAMP được thiết kế để làm việc tối ưu trong vùng 60–65°C, vì vậy toàn bộ hệ chip – đế nhiệt – buồng vi lưu phải được thiết kế xoay quanh khoảng nhiệt này. Trong thực tế, nhiệt độ bên trong buồng phản ứng luôn thấp hơn nhiệt độ trên bề mặt đế nhiệt do có lớp đế, lớp PDMS và dung dịch truyền nhiệt. Do đó, để duy trì dung dịch LAMP ở khoảng 63 °C, đế nhiệt được đặt ở khoảng 80 °C.

Điện cực làm việc, điện cực đối, điện cực tham chiếu, buồng vi lưu chứa mẫu và dây nối USB đều tích hợp trên cùng một nền, tạo thành hệ đo nhỏ gọn: đế nhiệt bên dưới cung cấp nhiệt, điện cực trên bề mặt theo dõi tín hiệu điện hoá của methylene blue (MB) trong quá trình khuếch đại.

Chuẩn bị mẫu và nạp vào buồng vi lưu

Thể tích phản ứng 25 µl được lựa chọn hơi lớn hơn thể tích của buồng vi lưu. Lý do là khi bơm bằng pipet, một phần nhỏ dung dịch sẽ nằm lại trong kênh dẫn; dùng dư mẫu giúp đảm bảo buồng phản ứng được lấp đầy hoàn toàn, không có bọt khí hay khoảng trống.

Hỗn hợp được chuẩn bị trong ống eppendorf, sau đó dùng pipet đẩy từ cổng vào (inlet) cho đến khi nhìn thấy dung dịch tràn tới cổng ra (outlet) hoặc lấp đầy

buồng phản ứng. Việc nạp như vậy giúp đảm bảo cùng một thành phần phản ứng ở mọi điểm trong buồng.

Thành phần và điều kiện phản ứng LAMP

Tổng thể tích 25 μl gồm:

+ 12,5 μl hỗn hợp phản ứng (reaction mix): chứa buffer, Mg^{2+} , dNTP, chất ổn định... theo thiết kế của bộ kit.

+ 1 μl Bst DNA polymerase (8 U): enzyme chịu nhiệt cao, xúc tác LAMP ở 63 °C.

+ 2 μl nước DI: bổ sung dung môi để đủ tổng thể tích.

+ Các primer:

- 2 μl F3 và 2 μl B3 (0,26 μM) – primer ngoài, khởi đầu và hỗ trợ khuếch đại.
- 0,5 μl FIP và 0,5 μl BIP (1,6 μM) – primer trong, chịu trách nhiệm chính tạo cấu trúc vòng và sản phẩm LAMP.
- 1 μl LF và 1 μl LB (0,8 μM) – primer vòng (loop primers), rút ngắn thời gian khuếch đại.

+ 2,5 μl DNA thô chiết xuất từ mẫu huyết tương: chứa hoặc không chứa HBV tùy mẫu.

Quy trình nhiệt:

Giữ ở 63°C trong 30 phút: đây là pha khuếch đại đẳng nhiệt, nơi enzyme Bst nhân bản vùng mục tiêu HBV nếu có.

Sau đó tăng lên 80°C trong 2 phút để bất hoạt Bst polymerase, “đóng băng” phản ứng, tránh khuếch đại tiếp sau thời gian quy định (quan trọng cho so sánh giữa mẫu).

Cách dùng methylene blue cho phát hiện real-time và end-point

MB đóng vai trò đầu dò redox hòa tan, xen cài vào dsDNA. Khi có nhiều sản phẩm LAMP, MB gắn vào DNA nhiều hơn \rightarrow lượng MB “tự do” giảm \rightarrow tín hiệu dòng điện hoá giảm. Thực hiện với hai phương pháp:

Real-time: thêm ngay 1 μl MB 260 μM vào master mix trước khi bắt đầu. MB có mặt suốt quá trình LAMP, cho phép theo dõi liên tục sự thay đổi tín hiệu khi sản phẩm hình thành.

End-point: MB chỉ được thêm vào cuối 30 phút khuếch đại, cùng với đệm đo; lúc này một phép đo duy nhất phản ánh lượng DNA đã tạo ra sau khi phản ứng kết thúc.

Các thí nghiệm đã thực hiện xác nhận rằng việc thêm MB trước hay sau phản ứng không làm thay đổi kết quả khuếch đại, nghĩa là nồng độ MB dùng không ức chế đáng kể Bst, đảm bảo độ tin cậy của phép đo.

Thiết lập phép đo SWV trên chip

Phép đo Voltammetry xung vuông (SWV) được lựa chọn do thời gian đo rất ngắn (≈ 4 s mỗi lần), ít làm gián đoạn điều kiện đẳng nhiệt, độ nhạy cao và ít nhiễu nền, phù hợp đo những thay đổi nhỏ trong nồng độ MB.

Tham số đo đã được tối ưu: Biên độ xung: 1 mV, Tần số: 12,5 Hz; Độ rộng xung: 5 mV. Đây là các tham số nằm trong dải thường dùng cho hệ vi điện cực, giúp đạt cân bằng giữa độ phân giải thế và cường độ dòng.

Toàn bộ phép đo được thực hiện trên thiết bị Autolab PGSTAT N32, đấu nối tới điện cực tích hợp qua dây USB; thiết bị điều khiển điện thế giữa điện cực làm việc – tham chiếu và ghi lại dòng qua điện cực làm việc – đối (working-counter electrode).

Quy trình đo theo thời gian thực

Chip được đặt lên đế nhiệt, nâng nhiệt độ cho đến khi nhiệt kế trong buồng phản ứng đọc 63 °C (đã hiệu chuẩn trước dựa trên mối quan hệ giữa nhiệt độ đế và nhiệt độ dung dịch).

Ngay khi nhiệt độ đạt 63 °C, thực hiện phép đo SWV đầu tiên để lấy giá trị dòng MB tại thời điểm $t = 0$. Sau đó tiếp tục duy trì 63°C và lặp lại phép đo mỗi 10 phút ($t = 10, 20, 30$ phút).

Ở mỗi lần đo, phổ SWV cho một đỉnh dòng đặc trưng của MB; chiều cao đỉnh được trích ra làm thông số định lượng. Giảm dần cường độ đỉnh theo thời gian phản ánh quá trình LAMP tạo dsDNA.

Mỗi chuỗi đo được lặp ít nhất hai lần (với các chip hoặc mẫu khác nhau) để kiểm tra độ lặp lại; chỉ khi các đường I-t trùng tốt, hệ mới được coi là ổn định.

Đối chiếu với các phương pháp chuẩn

Sau khi kết thúc thí nghiệm, một phần sản phẩm được lấy ra khỏi buồng vi lưu (hoặc từ phản ứng song song trong ống) để chạy gel agarose: nếu mẫu dương tính có vệt DNA nhiều bậc và mẫu âm không có dải đặc hiệu, điều này xác nhận LAMP hoạt động tốt.

Đồng thời, có thể so sánh với đọc huỳnh quang (ví dụ thuốc nhuộm intercalating như SYBR Green) để chứng minh rằng xu thế tăng tín hiệu huỳnh quang trùng với xu thế giảm dòng MB trên chip.

Sự tương đồng giữa điện di, huỳnh quang và kết quả SWV trên biochip cho thấy chip LAMP–MB–SWV cho phép theo dõi và định lượng HBV theo thời gian thực bằng điện hoá với độ tin cậy tương đương, nhưng dùng ít mẫu và thao tác hơn.

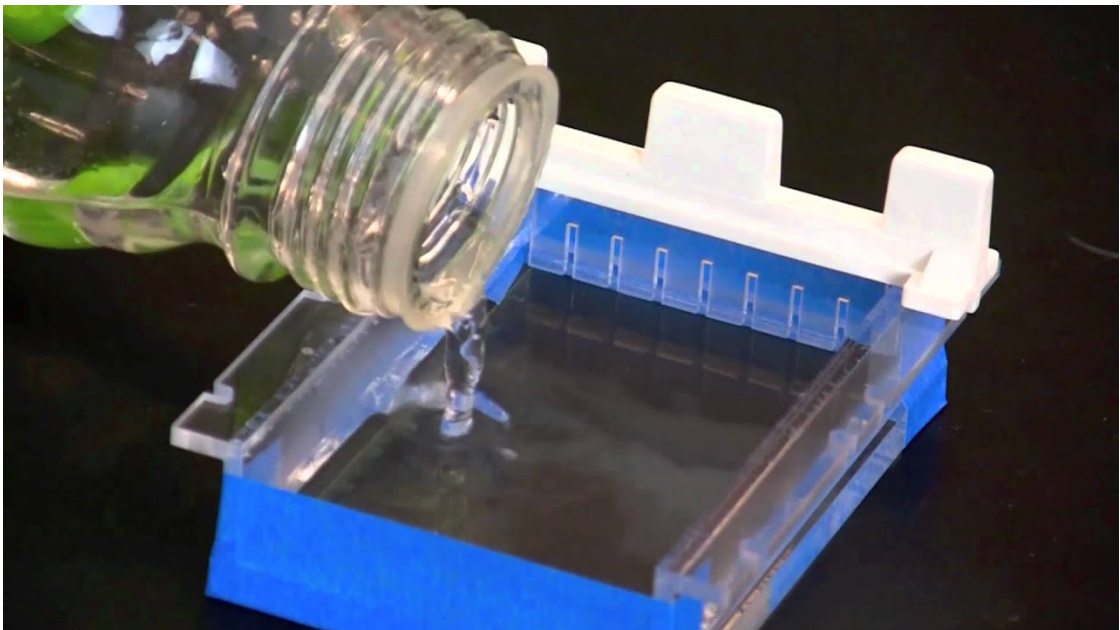
2.1.3.2. Điện di trên gel:

Thực hiện theo quy trình sau

1. Chuẩn bị gel agarose:

- Agarose là một loại polysaccharide tự nhiên được chiết từ tảo biển. Gel agarose sử dụng trong điện di thường ở nồng độ 0.5 ~ 2%, tùy vào kích thước DNA cần phân tách.

- Khi đổ gel agarose, một chiếc lược sẽ được cắm lên trên miếng gel và gỡ ra khi gel đã đông đặc để tạo thành các giếng cho phép nạp mẫu vào.



Hình 2.4. Đổ gel agarose vào bể chứa

2. Chạy điện di trên gel agarose:

- Miếng gel agarose được đặt trong bồn điện di, chứa dung dịch đệm (buffer) dẫn điện và ổn định pH, thường là Tris-acetate-EDTA (TAE) hoặc Tris-Borate-EDTA (TBE).

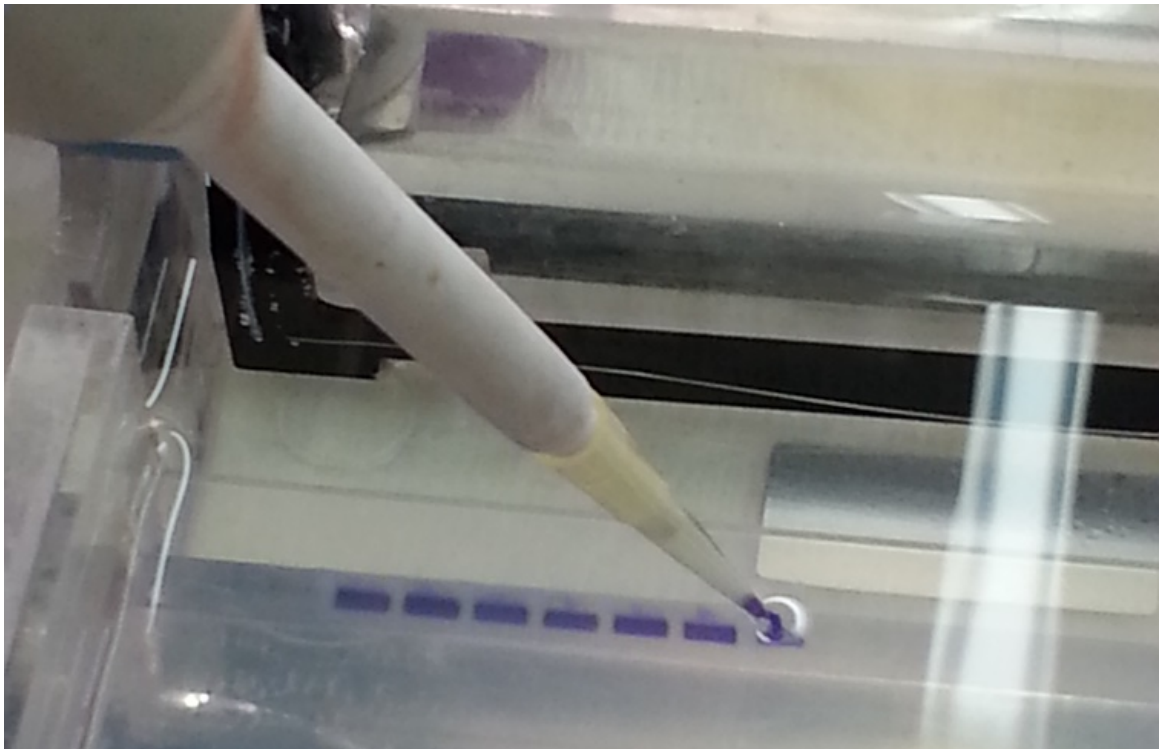
- Mẫu DNA được pha với dung dịch nạp mẫu (loading dye) nhằm giữ mẫu chìm trong giếng và cung cấp chỉ thị màu để nhận biết sự điện di.

3. Quan sát DNA sau khi điện di:

- Cần phải nhuộm gel để quan sát do DNA “vô hình” với mắt thường, phổ biến nhất là nhuộm bằng hóa chất huỳnh quang, chẳng hạn như Ethidium Bromide (EtBr).. Tùy vào loại hóa chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng, có thể bổ sung chúng vào agarose trước khi đổ gel hoặc sau khi chạy điện di để nhuộm

- Sau khi điện di và nhuộm gel xong, có thể thực hiện ghi nhận hình ảnh DNA thông qua hệ thống đọc gel (gel document system) hay còn gọi là hệ thống chụp ảnh gel. Hệ thống đọc gel gồm nguồn chiếu sáng (illumination source), bộ lọc (filter) để loại bỏ ánh sáng nền và camera để ghi nhận hình ảnh, đôi khi còn tích hợp PC và trang bị màn hình cảm ứng.

Đối với điện di trên gel, chúng tôi sử dụng 5 μ l sản phẩm khuếch đại LAMP cùng thuốc nhuộm (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.



Hình 2.5. Nạp mẫu vào các giếng

2.1.3.3. Phát hiện huỳnh quang

Để kiểm tra huỳnh quang trực quan, 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.

2.1.4. 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

Hiện đang có nhu cầu lớn về việc phát triển các công cụ chẩn đoán di động để phát hiện virus và các vi sinh vật gây bệnh ngay tại hiện trường trong những điều kiện ngặt nghèo về mặt tài nguyên. Các thiết bị, công cụ này cung cấp nhiều lợi thế để phát hiện các mầm bệnh khác nhau bao gồm tính di động, tự động hóa, tốc độ, chi phí và hiệu quả. Để đạt được khả năng phát hiện mục tiêu sớm và có độ nhạy cao, các công nghệ khuếch đại phân tử nên được tích hợp vào các công cụ chẩn đoán đó. Khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (LAMP) là một trong những kỹ thuật di truyền tiên tiến nhất có thể cung cấp tiến trình tuần tự cực nhanh (dưới 1 giờ) và độ chọn lọc tương đối cao.

Việc phát triển các công cụ chẩn đoán di động, chi phí thấp để phát hiện virus và vi sinh vật gây bệnh tại hiện trường là nhu cầu lớn nhưng vẫn còn nhiều thách thức. Trong nghiên cứu này, NCS đề xuất một phương pháp mới dựa trên màng graphene oxit khử-polyaniline (rGO-PANi) để phát hiện tại chỗ các sản phẩm khuếch đại đẳng nhiệt LAMP bằng phương pháp đo điện thế mạch hở. PANi, một loại polyme dẫn điện nhạy với sự thay đổi pH được đưa vào điện cực in lưới phủ rGO. Màng PANi sau đó được điều chỉnh đến trạng thái muối emeraldine, có độ dẫn điện cao nhất từ đó cho độ nhạy pH được tối đa hóa. Bằng cách kết hợp PANi và rGO, độ nhạy pH của hệ thống đã được điều chỉnh lên đến khoảng 64 mV trên mỗi đơn vị pH. Điều

này cho phép theo dõi số lượng amplicon được khuếch đại từ quá trình khuếch đại đẳng nhiệt. Sau đó, cảm biến được kiểm tra để theo dõi các phản ứng LAMP, sử dụng virus Viêm gan B (HBV). Chế tạo lớp cảm biến đơn giản, chi phí thấp, có thể tái sử dụng và độ nhạy tốt là các ưu điểm của cảm biến điện hóa được trình bày trong phần này. Các kết quả đem tới kỳ vọng cho việc thiết kế các thiết bị xét nghiệm tại chỗ trong các điều kiện tài nguyên hạn chế.

Để cảm biến được sự thay đổi nồng độ pH của dung dịch phản ứng, cần sử dụng màng mỏng nhạy với pH. Màng mỏng này phải thỏa mãn hai yêu cầu quan trọng: độ nhạy cao với ion H^+ hoặc OH^- ; và độ dẫn điện cao. Polyme dẫn điện nhạy cảm với pH (tức là polyaniline) đáp ứng các tiêu chí này. Trong các tài liệu, người ta biết rằng polyaniline là một màng nhạy cảm với pH với phản ứng khoảng vài chục milivôn trên đơn vị pH ở nhiệt độ phòng. Độ nhạy pH của polyaniline là do sự proton hóa (proton hóa) và sự khử hóa (deprotonation) của trạng thái oxy hóa dẫn, cụ thể là emeraldine. Các báo cáo đã chứng minh rằng polyaniline có phản ứng điện thế cao nhất đối với sự thay đổi pH so với các polyme dẫn điện khác. Tuy nhiên, polyaniline dẫn điện tốt hơn ở pH nhỏ hơn 5,0 và trở nên kém hơn dẫn điện ở khoảng pH cao hơn.

Để cải thiện độ dẫn điện của màng polyaniline ở khoảng pH của phản ứng LAMP (7,0–9,0), vật liệu cacbon là những ứng cử viên hàng đầu. Với cấu trúc điện tử đặc biệt, graphene và các dẫn xuất của nó mang lại độ dẫn điện vượt trội và sự dẻo dai cần thiết cho các hệ thống cảm biến điện hóa dùng một lần. Ngoài ra, các vật liệu này còn có tính tương hợp sinh học. So với graphene, graphene oxit dạng khử (rGO) có các thuộc tính tương tự bao gồm độ dẫn điện cao, diện tích bề mặt lớn và dễ chức năng hóa. Chúng có thể được sản xuất thông qua các phương pháp hóa học với chi phí thấp và năng suất cao. Dạng khử của oxit graphene (rGO) cũng có lượng oxy dồi dào và hoàn toàn có thể dùng để cải thiện độ nhạy pH của màng polyaniline. Một cảm biến pH dựa trên polyaniline được chức năng hóa bởi oxit graphene khử (PANi-rGO) để theo dõi quá trình lên men vi sinh vật đã được báo cáo gần đây. Composite PANi-rGO cũng được chứng minh là có độ dẫn điện và điện dung cao cho các siêu tụ điện hóa hiệu quả.

Như vậy, phần này của luận án tôi sẽ mô tả việc sử dụng PANi với đặc tính là nhạy với sự thay đổi nồng độ 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 xuyên suốt quá trình phản ứng LAMP. Đầu tiên, màng mỏng được chế tạo thông qua quá trình khử điện hóa của oxit graphene bằng phương pháp nhỏ phủ (drop cast), và tiếp theo là quá trình mạ điện của PANi trong dung dịch axit. Các phép đo thế mạch hở (OCP) được sử dụng để

phát hiện amplicon được khuếch đại. Cần nhấn mạnh rằng phép đo OCP có độ nhạy cao và có thể lặp lại. Thật vậy, mặc dù việc phát hiện các sản phẩm LAMP đã được chứng minh trước đây với phép đo điện thế, tuy nhiên, phương pháp này có thể kích hoạt sự thay đổi trạng thái oxy hóa đáng kể của PANi trong quá trình đo dòng điện / điện thế, dẫn đến tín hiệu không chính xác. Ngược lại, kỹ thuật OCP của chúng tôi sẽ cung cấp một quy trình phát hiện đơn giản và chính xác hơn vì nó có thể được thực hiện mà không ảnh hưởng đến thế hay dòng của hệ thống. Do đó, việc thực hiện các phép đo kế tiếp hay nhiều phép đo có thể được đảm bảo và phân tích rõ ràng mà không ảnh hưởng đến màng trên điện cực.

2.2.2. Vật liệu và phương pháp

Graphene oxit (GO) được điều chế từ bột than chì bằng cách sử dụng một phiên bản cải tiến của phương pháp Hummer. Anilin ($C_6H_5NH_2$) được mua từ Sigma Aldrich (Mỹ). Dung dịch đệm nước muối có đệm photphat (PBS, pH 7.4) được sử dụng làm chất điện phân hỗ trợ. Tất cả các hóa chất đều thuộc loại phân tích và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Ngoài ra, nước sử dụng trong thí nghiệm là nước cất đã được chưng cất lại. Điện cực carbon in lưới (SPE) với thiết lập ba điện cực (đường kính của điện cực làm việc là 3 mm) được mua từ Quasense (Thái Lan). Thuốc thử khuếch đại LAMP (Bộ phụ kiện khuếch đại DNA Loopamp) được cung cấp bởi Eiken (Nhật Bản). Một bộ sáu môi được thiết kế theo y văn để xác định đích xác HBV trong máu người. Bộ môi bao gồm hai môi ngoài (F3, B3), hai môi trong (FIP, BIP) và hai môi vòng (LF, LB). Tất cả các môi đều được MacroGen (Seoul, Hàn Quốc) tổng hợp thương mại tương tự như đã thực hiện ở phần trước.

2.2.3. Nội dung nghiên cứu

2.2.3.1. Chuẩn bị màng rGO / PANi

Cảm biến nhạy pH dựa trên màng 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 lên bề mặt trên 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.

2.2.3.2. Kiểm tra độ pH

Các phép đo hiệu chuẩn pH được thực hiện bằng cách sử dụng bộ đệm PBS với nồng độ pH được điều chỉnh từ 6.0 đến 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, gây ra do sự thay đổi pH. Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành ở nhiệt độ phòng. Các phép đo được thực hiện trên thiết bị Metrohm Autolab PGSTAT 302N kết nối điều khiển bởi máy tính (Metrohm Co., Ltd., Thụy Sĩ).

2.2.3.3. Phản ứng LAMP

Hỗn hợp LAMP được chuẩn bị như đã mô tả trong mục 2.1. 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 5 μl mẫu. Phản ứng LAMP được thực hiện ở 65°C và sau đó dừng lại ở 84°C. Thí nghiệm được thực hiện trong thời gian khác nhau (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 H_2SO_4 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. Các thành phần trên đều được thảo luận về ưu, nhược điểm cũng như các thông số ảnh hưởng đến tín hiệu đầu ra của thiết bị. Ngoài ra, các hạn chế khi sử dụng phương pháp quang khắc cũng sẽ được nhắc đến.

Trong phần trình bày thiết kế đế nhiệt sẽ bao gồm cả bản vẽ CAD được vẽ bằng phần mềm AutoCAD và phần mô phỏng sử dụng COMSOL Multiphysics Software để đánh giá độ đồng đều của gradient nhiệt.

Mục đích cần đạt được là thiết kế một thiết bị đơn giản với người sử dụng, nhanh, nhạy, rẻ tiền và có khả năng tái sử dụng, để thực hiện quá trình khuếch đại DNA đẳng nhiệt (LAMP) và cung cấp các thông tin điện hóa đến thiết bị ngoại vi. Việc hạn chế sử dụng hóa chất, thiết bị phòng thí nghiệm đắt tiền để vận hành thiết bị đi cùng với đơn giản hóa khâu vận hành cũng là những yếu tố được xem xét đến.

Tiêu chí thiết kế đầu tiên được chú ý là khối lượng mẫu sử dụng. Một thí nghiệm dựa trên DNA thông thường dùng 25 μL thể tích tổng cộng để phân tích do các tiền chất (reagent) được dùng như polymerase enzyme và các primer tốn nhiều chi phí để chuẩn bị ở thể tích lớn và nồng độ cao. Các quá trình làm giàu cũng như các bước làm sạch thường được chuẩn bị trước khi thực hiện khuếch đại DNA để đạt tới ngưỡng nồng độ phát hiện được của mẫu. Do đó, 25 μL là kích cỡ được chọn cho thể tích của giếng/buồng phản ứng.

Tiêu chí tiếp theo là độ nhớt của mẫu. Đây là một yếu tố quan trọng cần phải được xem xét đến khi tiến hành thí nghiệm vi lưu. Mẫu sẽ qua các bước chuẩn bị trước (làm giàu, làm sạch...) nên khi thực hiện, DNA sẽ tồn tại trong dung dịch đậm và mẫu này có độ nhớt tương tự như nước. Do đó, mẫu DNA-dung dịch đậm được sử dụng là mẫu để thực hiện thí nghiệm.

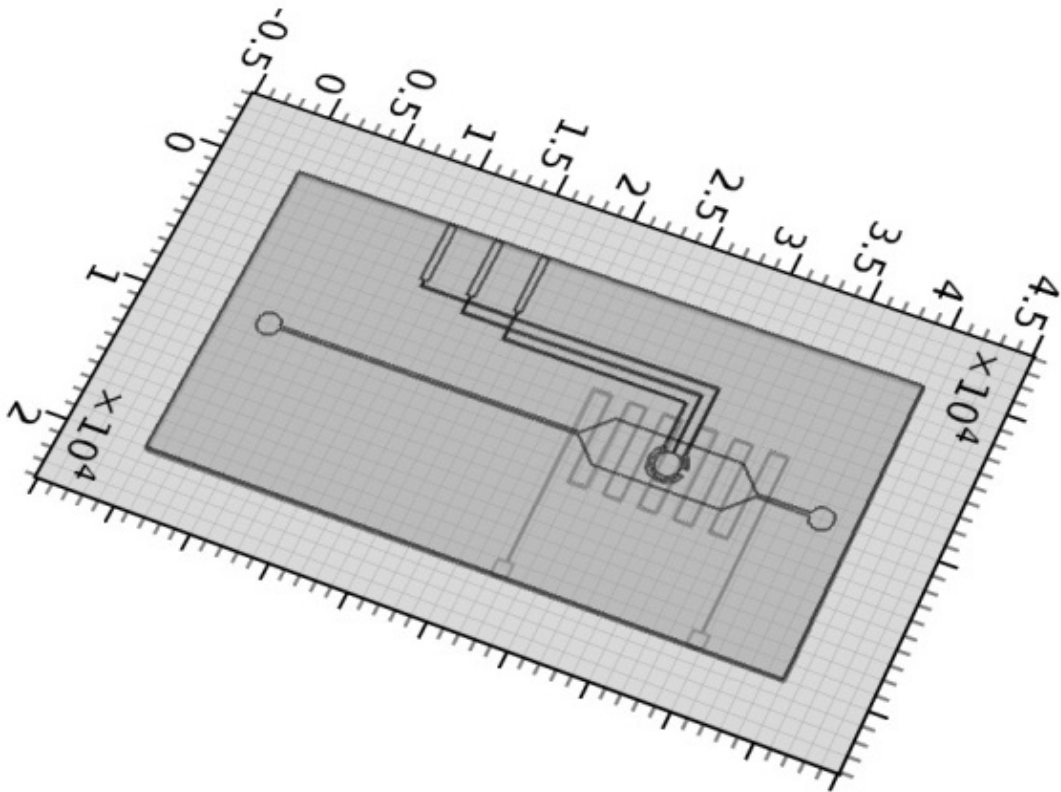
Một tiêu chí quan trọng khác trong thiết kế thiết bị là giá thành và thời gian cần thiết để vận hành thiết bị. Một số thành phần có ảnh hưởng trực tiếp đến giá thành của thiết bị có thể kể đến như hệ thống đế nhiệt cung cấp nhiệt độ 60 - 65°C cho quá trình LAMP, hệ thống ghi nhận và phân tích tín hiệu điện hóa đầu ra. Để giảm chi

phí chế tạo và đảm bảo yêu cầu trong quá trình nghiên cứu, một số phương pháp chế tạo khác nhau như in 3D hay quang khắc đều đã được cân nhắc sử dụng.

Cuối cùng, sự đơn giản trong vận hành, sử dụng là một tiêu chí thiết kế khác. Một chip vi lưu tối ưu là một thiết bị không cần đến những kỹ thuật nâng cao hay những kỹ thuật viên để có thể vận hành và phân tích dữ liệu đầu ra. Phần tiếp theo tôi sẽ mô tả thiết kế thiết bị vi lưu.

2.3.2. Vật liệu phương pháp

Dựa theo tiêu chí thiết kế đã đưa ra ở trên, tôi đã xây dựng và hoàn thiện thiết kế thiết bị vi lưu để thực hiện xét nghiệm nhanh dựa trên phép đo điện hóa (*electrochemical detection*) và phương pháp khuếch đại DNA đẳng nhiệt LAMP. Thiết bị gồm 3 phần chính: hệ kênh vi lưu, cảm biến điện hóa và đế nhiệt. Thiết kế của thiết bị được thể hiện trên Hình 2.6.



Hình 2.6. Thiết kế và kích thước thiết bị vi lưu tích hợp.

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*.

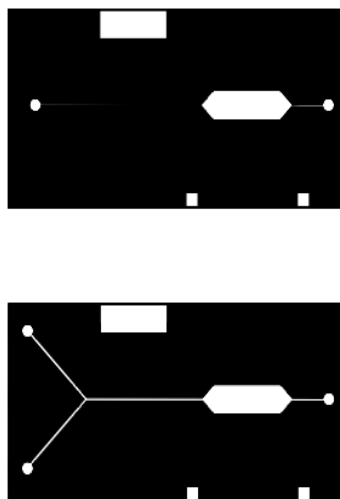
Dụng cụ, thiết bị và hóa chất

- Phần mềm thiết kế AutoCAD 2007
- Giấy kính PET
- Hệ thiết bị quang khắc (photolithography)
- Thiết bị quay phủ (spin coater)
- Lò plasma
- Bơm hút chân không
- Lam kính
- SU-8/dung dịch tráng rửa
- Acetone, iso-propanol, nước khử ion
- PDMS, chất làm đông
- Đé nhiệt

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



Hình 2.7. Mặt nạ chứa các chi tiết thiết kế kênh dương.

Các thiết kế trên mask gồm có hai loại kênh với hình dạng khác nhau: một đầu vào và hai đầu vào.

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 khuôn 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 và xử lý đế silicon

Với đế silicon mới: rửa bằng ethanol và nước khử ion để loại bụi bẩn, dầu mỡ bề mặt, sau đó thổi khô bằng khí nitrogen nhằm tránh để lại vết loang của dung môi trên bề mặt.

Với đế đã sử dụng: chuẩn bị dung dịch piranha với tỉ lệ thể tích $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2 = 7/3$; đây là dung dịch oxy hóa rất mạnh, giúp loại bỏ lớp hữu cơ bám cứng trên bề mặt silicon và làm bề mặt ưa nước hơn, tăng độ bám của lớp cản quang.

Ngâm đế silicon trong piranha 10–15 phút, sau đó lấy ra rửa kỹ bằng nước khử ion để loại bỏ hoàn toàn axit dư. Tiếp tục rửa tuần tự trong acetone \rightarrow IPA \rightarrow nước khử ion để loại sạch cặn vô cơ/hữu cơ còn lại.

Thổi khô đế bằng khí nitrogen để bề mặt khô sạch, không bám bụi. Trước khi sử dụng, đặt đế vào tủ sấy ở 200 °C trong 15 phút; bước “bake” này giúp làm khô sâu, loại ẩm trong nền silicon, tăng độ bám dính của SU-8. Sau đó để đế nguội về nhiệt độ phòng trong môi trường sạch.

Bước 2. Quay phủ lớp cản quang SU-8

Đặt đế silicon lên mâm quay của máy spin-coater, cố định bằng lực hút chân không để đế không bị xô dịch khi quay.

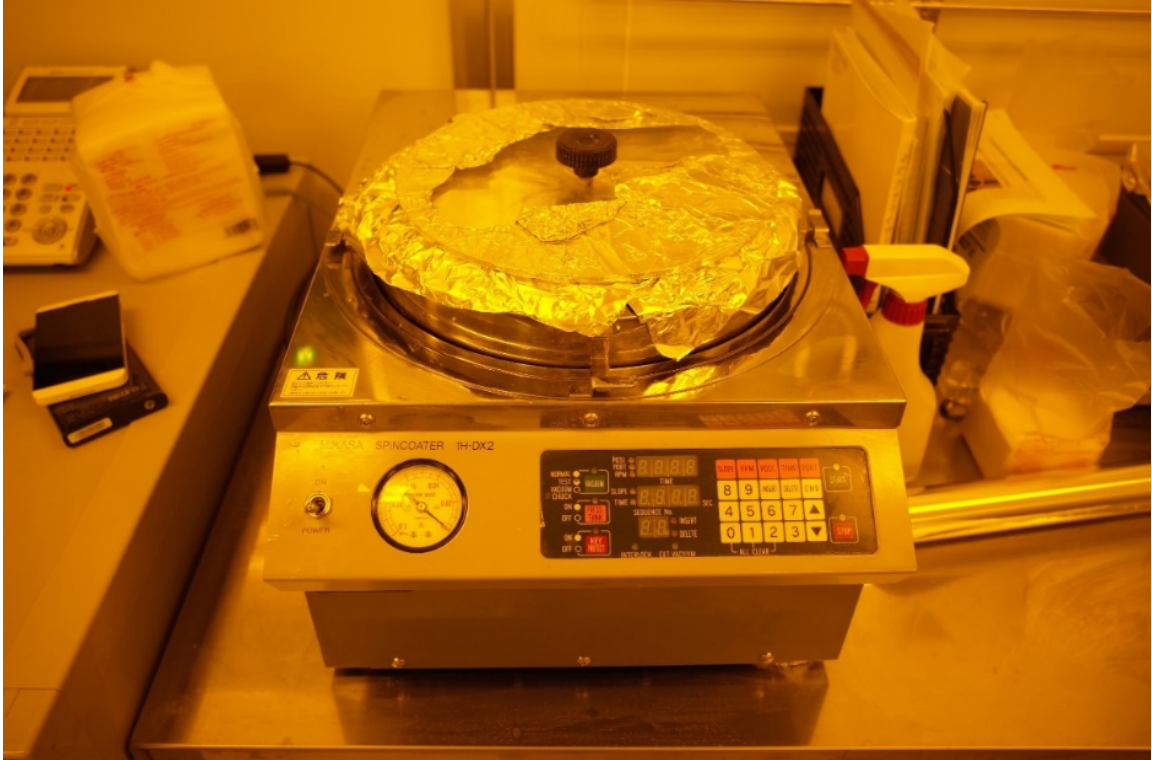
Nhỏ lượng SU-8 thích hợp lên tâm đế (tỷ lệ ước tính 1 ml SU-8 cho đế đường kính 25 mm), đảm bảo lớp phủ đủ để tràn đều khi quay, tránh tạo lỗ trống.

Thiết lập chương trình quay gồm hai giai đoạn:

- Giai đoạn 1: 500 vòng/phút trong 10 giây, gia tốc 100 vòng/phút/giây, nhằm dàn đều SU-8 trên toàn bộ bề mặt đế.

- Giai đoạn 2: 3000 vòng/phút trong 30 giây, gia tốc 300 vòng/phút/giây, để điều chỉnh bề dày lớp SU-8 về giá trị mong muốn (tốc độ cao hơn cho lớp mỏng hơn).

Sau khi quay, SU-8 tạo thành một lớp màng đồng nhất trên bề mặt đế, chiều dày quyết định bởi tốc độ, thời gian quay và độ nhớt của dung dịch.



Hình 2.8. Thiết bị quay phủ (MIKASA – 1HDX2) đặt tại phòng sạch thuộc khu công nghệ cao JAIST, Nhật Bản.

Bước 3. Gia nhiệt trước quang khắc (Soft-bake)

Đặt đế silicon đã phủ SU-8 lên hotplate hoặc trong lò sấy ở 95 °C trong 4 phút. Đây là bước “soft-bake” giúp bay bớt dung môi trong SU-8, ổn định màng, hạn chế bọt khí và giảm hiện tượng chảy khi mang đi chiếu sáng.

Sau khi gia nhiệt, để mẫu nguội tự nhiên về nhiệt độ phòng trong môi trường sạch để tránh tạo ứng suất nhiệt gây nứt, cong vênh lớp SU-8.

Bước 4. Quang khắc

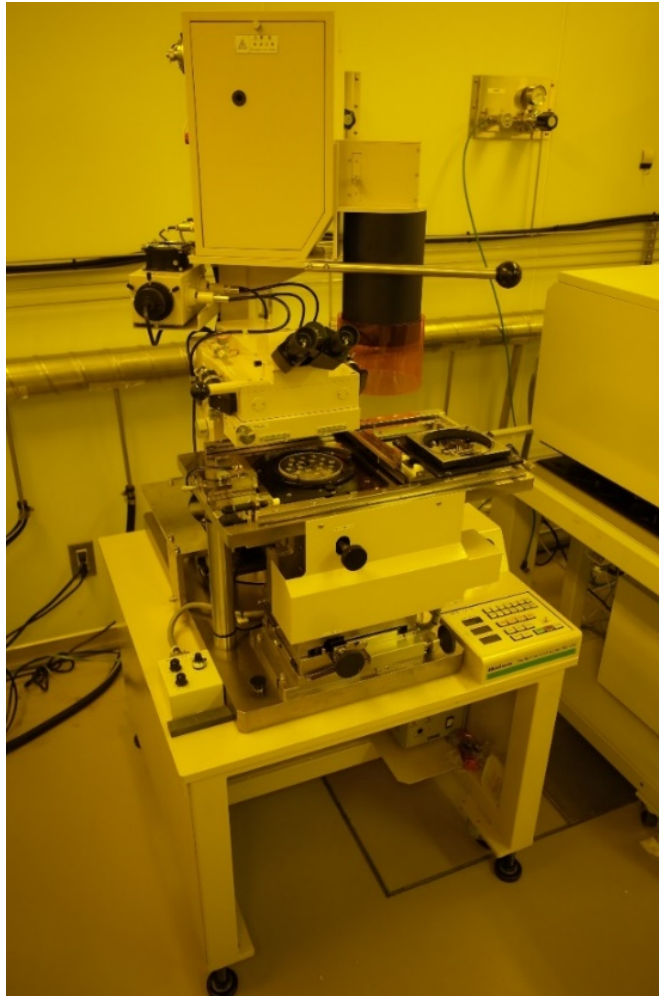
Chuẩn bị mặt nạ quang chứa các chi tiết kênh dương; mặt nạ này được gắn lên một tấm kính 5×5 inch để lắp vào hệ quang khắc dễ dàng, đảm bảo mặt mẫu phẳng.

Lắp mặt nạ vào máy quang khắc (mask aligner), căn chỉnh sao cho bề mặt mặt nạ sạch, không bụi, không xước; điều này rất quan trọng để đảm bảo đường biên họa tiết sắc nét.

Trên hệ quang khắc, thiết lập thông số chiếu: liều UV 225 mJ/cm² và thời gian chiếu 10 giây; liều này được tối ưu cho độ dày SU-8 đang sử dụng, đảm bảo vùng được chiếu được quang hóa hoàn toàn.

Đặt đế silicon/SU-8 vào vị trí giữ mẫu dưới mặt nạ, dùng hệ căn chỉnh (UNICON Double View Mask Aligner PEM-800) để căn trùng họa tiết mặt nạ với vị trí cần tạo kênh trên đế.

Khi đã căn chỉnh xong, đóng khe hở giữa mặt nạ và mẫu theo chế độ tiếp xúc phù hợp (contact/proximity), sau đó khởi động chu trình chiếu. Ánh sáng UV xuyên qua vùng trong suốt trên mặt nạ, quang hóa SU-8 ở những vùng này, tạo vùng cứng hóa theo hình kênh dương.



Hình 2.9. Hệ thiết bị quang khắc tích hợp được đặt trong phòng sạch thuộc khu công nghệ cao JAIST, Nhật Bản.

Bước 5. Gia nhiệt sau quang khắc (Post-exposure bake)

Sau khi chiếu xong, lấy đế silicon/SU-8 ra khỏi hệ quang khắc và đặt lên đế nóng ở 95 °C trong 5 phút.

Bước “post-exposure bake” này giúp hoàn tất quá trình trùng hợp chéo của SU-8 ở vùng đã được chiếu sáng, làm lớp này cứng hơn, bền hóa học hơn và bám chắc vào đế trước khi mang đi tráng rửa.

Bước 6. Tráng rửa (Develop)

Ngâm mẫu silicon/SU-8 vào dung dịch tráng rửa (developer) chuyên dụng cho SU-8 trong 2–4 phút. Trong thời gian này, phần SU-8 không được chiếu sáng (chưa trùng hợp) sẽ bị hòa tan vào dung dịch, trong khi phần đã chiếu/cứng hóa vẫn bám trên đế.

Quan sát nếu cần, có thể nhẹ nhàng lắc hoặc khuấy để quá trình hòa tan diễn ra đồng đều, tránh quá thời gian làm mòn chân họa tiết.



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

Bước 7. Rửa sạch và sấy khô

Chuẩn bị ba khay: khay thứ nhất chứa dung dịch tráng rửa sạch (để rửa lại nhanh), khay thứ hai chứa iso-propanol (IPA), khay thứ ba chứa nước khử ion.

Sau quá trình develop, chuyển nhanh mẫu sang khay developer sạch trong khoảng 10 giây để loại bỏ cặn còn đọng trên bề mặt, rồi chuyển tiếp sang khay IPA khoảng 10 giây nhằm trung hòa, rửa sạch developer bám trên SU-8.

Cuối cùng rửa trong nước khử ion khoảng 10 giây để loại hết dấu vết dung môi hữu cơ, rồi thổi khô bằng súng nitrogen. Bề mặt lúc này phải sạch, không để lại vệt loang, các cấu trúc kênh SU-8 sắc nét theo hình mặt nạ.

Bước 8. Gia nhiệt cuối (Hard-bake)

Đưa sản phẩm vào lò sấy ở 150 °C trong 5 phút. Bước “hard-bake” giúp tăng thêm sự trùng hợp chéo và làm SU-8 bền nhiệt, bền cơ học và bền hóa học hơn, rất quan trọng nếu khuôn này dùng để đúc PDMS hoặc chịu nhiều lần xử lý sau đó.

Sau khi gia nhiệt, để mẫu nguội tự nhiên về nhiệt độ phòng trong môi trường sạch; thu được khuôn/mặt nạ SU-8 chứa các kênh dương đúng theo thiết kế, sẵn sàng cho bước đúc hoặc sử dụng tiếp theo.

2.3.3.3. Chế tạo vi kênh trên vật liệu PDMS

Hệ vi kênh được chế tạo trên vật liệu PDMS theo các bước dưới đây:

Bước 1. Chuẩn bị và trộn PDMS

- Đầu tiên chuẩn bị bộ kit Sylgard 184, gồm phần nền PDMS và chất đóng rắn (curing agent). Tỷ lệ được dùng là 10:1 theo khối lượng (hoặc thể tích), nghĩa là 10 phần PDMS nền và 1 phần chất đóng rắn.

- Hai thành phần được trộn kỹ trong cốc sạch cho đến khi hỗn hợp đồng nhất hoàn toàn; việc trộn đều rất quan trọng vì ảnh hưởng trực tiếp đến độ cứng và độ bền cơ học của PDMS sau khi đóng rắn.

Bước 2. Khử bọt khí và đúc trên khuôn

- Hỗn hợp PDMS sau khi trộn thường chứa nhiều bọt khí nhỏ; để loại bỏ, đưa cốc chứa PDMS vào buồng chân không và hút chân không cho đến khi các bọt khí nổi lên và vỡ hết.

- Khuôn (master) SU-8 có các kênh dương đã chế tạo trước đó được đặt trong một khay tròn/phẳng, mặt có cấu trúc quay lên trên.

- Rót từ từ PDMS đã khử bọt lên khuôn, bắt đầu từ một mép và để PDMS tự tràn đều, đồng thời quan sát và xử lý ngay các bọt khí lớn bằng que hoặc kim nếu còn xuất hiện; mục tiêu là bề mặt PDMS phải phẳng và không có bọt nằm trên nóc các kênh.

Bước 3. Đóng rắn PDMS

- Sau khi rót xong, đưa khay chứa khuôn và PDMS vào tủ sấy/hotplate, đặt nhiệt độ 120 °C trong khoảng 2 giờ. Ở nhiệt độ này, phản ứng đóng rắn xảy ra, PDMS chuyển dần từ dạng lỏng nhớt sang dạng đàn hồi rắn.

- Kết thúc thời gian đóng rắn, để mẫu nguội về nhiệt độ phòng trong tủ hoặc ngoài phòng sạch để tránh cong vênh do sốc nhiệt. Sau đó nhẹ nhàng bóc lớp PDMS ra khỏi khuôn, thu được tấm PDMS có các kênh âm (rãnh) với hình dạng đúng như thiết kế ban đầu.

Bước 4. Làm sạch và chuẩn bị gắn PDMS–kính

- Tấm PDMS chứa vi kênh được cắt về kích thước mong muốn, đục lỗ vào các vị trí cổng vào/ra (inlet/outlet) bằng punch hoặc kim phù hợp.

- Miếng PDMS và lam kính (hoặc đế glass/SiO₂) được rửa lần lượt bằng iso-propanol và nước khử ion để loại bụi và dầu bám trên bề mặt, sau đó thổi khô bằng súng nitrogen; bước này giúp bề mặt sạch và giảm nguy cơ bọt khí khi gắn.

Bước 5. Xử lý plasma và gắn kín kênh

- PDMS và lam kính được đặt vào buồng xử lý plasma (SAMCO Model FA-1). Trên bảng điều khiển chọn chương trình “Program 2” với các thông số: khí O₂, giai đoạn pumping 30 s (hút chân không), tiếp theo cấp khí (gas supply) trong 1 phút, sau đó kích hoạt plasma O₂ trong 30 s với công suất 30% (O₂ 100%), rồi thực hiện các bước xả khí/ôn định: plushing 10 s và venting 20 s.

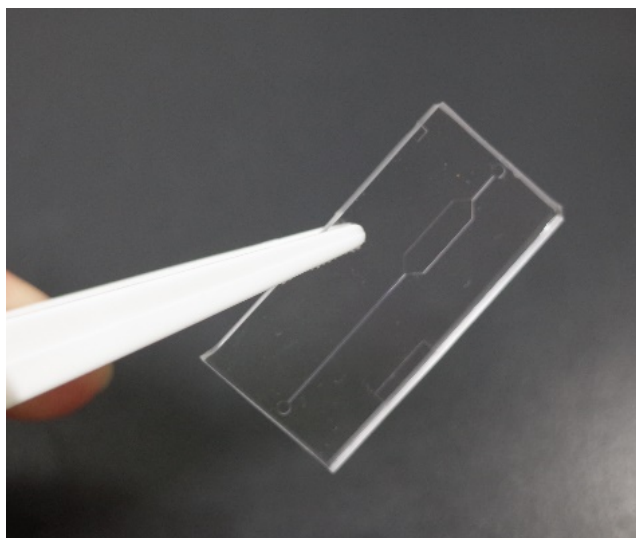
- Plasma O₂ sẽ oxy hóa nhẹ bề mặt PDMS và kính, tạo nhiều nhóm silanol (–Si–OH), làm bề mặt trở nên ưa nước và sẵn sàng hình thành liên kết cộng hóa trị Si–O–Si khi hai bề mặt được ép sát, tạo liên kết rất bền, chống rò rỉ.

Bước 6. Gắn chip vi lưu

- Ngay sau khi kết thúc chu trình plasma, nhanh chóng lấy PDMS và lam kính ra khỏi buồng; thời gian hiệu quả của bề mặt hoạt hóa khá ngắn nên cần thực hiện thao tác gắn trong vòng khoảng 30 giây.

- Cần thận căn chỉnh vị trí kênh trên PDMS với lam kính, sau đó đặt PDMS xuống bề mặt kính và dùng lực ép đều lên toàn bộ bề mặt (có thể dùng con lăn sạch hoặc ngón tay đeo găng) để loại bỏ bọt khí và đảm bảo mọi vùng kênh đều tiếp xúc tốt.

- Để mẫu nghỉ một thời gian (vài phút đến vài chục phút) ở nhiệt độ phòng; trong thời gian này các liên kết Si–O–Si hình thành hoàn chỉnh, tạo thành một chip vi kênh PDMS gắn bền lên kính, sẵn sàng cho các thí nghiệm vi lưu.



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

Bước 1. Làm sạch đế silicon

- Đế silicon dùng để chế tạo khuôn cho điện cực/đế gia nhiệt được làm sạch theo đúng quy trình đã áp dụng khi chế tạo khuôn kênh vi lưu: rửa dung môi, xử lý piranha (nếu cần), rửa nước khử ion và sấy khô.

- Mục tiêu là loại hoàn toàn tạp chất hữu cơ và bụi trên bề mặt, đảm bảo lớp cản quang bám tốt và cấu trúc sau quang khắc sắc nét.

Bước 2. Quay phủ lớp LOR-10B (lớp lift-off)

- Đặt đế silicon lên mâm quay của spin coater. Nhỏ lượng Microchem LOR-10B lên giữa đế (tỉ lệ tham khảo: 1 ml LOR cho đế đường kính 20 mm), đảm bảo đủ để phủ kín bề mặt.

- Thiết lập chương trình quay hai bước:

+ 500 vòng/phút trong 10 s với gia tốc 100 vòng/phút/s để dàn đều dung dịch.

+ 3000 vòng/phút trong 30 s với gia tốc 300 vòng/phút/s để đạt bề dày LOR-10B mong muốn (thường là vài trăm nm).

- Kết quả là một lớp LOR-10B mỏng, đồng đều trên bề mặt silicon; lớp này về sau sẽ giúp thực hiện quy trình lift-off thuận lợi khi tạo điện cực kim loại.

Bước 3. Gia nhiệt LOR-10B

Đặt đế silicon đã phủ LOR-10B lên đế nhiệt/hotplate ở 60 °C trong 10 phút. Bước bake nhẹ này giúp dung môi bay hơi, ổn định lớp phim, tăng độ bám dính, đồng thời giữ được tính năng hòa tan chọn lọc của LOR trong dung dịch developer chuyên dụng.

Bước 4. Quay phủ lớp OFPR-800

Ưu điểm khi dùng OFPR-800: Cho hình ảnh quang khắc sắc nét, phù hợp với các cấu trúc điện cực, đế gia nhiệt kích thước micromet; Tương thích tốt với hệ hai lớp LOR-10B/OFPR-800, nên rất thuận tiện cho quy trình lift-off tạo điện cực Ti/Au, Pt,...; Dễ xử lý: quy trình quay phủ, sấy, chiếu và tráng rửa đơn giản, có thể lặp lại ổn định nhiều wafer.

- Sau khi LOR nguội về nhiệt độ phòng, tiếp tục quay phủ lớp cản quang dương Microchem OFPR-800 bên trên.

- Nhỏ OFPR-800 lên đế, thiết lập chương trình quay hai bước:

+ 500 vòng/phút trong 10 s (gia tốc 100 vòng/phút/s) để dàn đều.

+ 2000 vòng/phút trong 30 s (gia tốc 300 vòng/phút/s) để đạt bề dày mong muốn, dày hơn LOR một chút.

- Lúc này đế silicon mang cấu trúc hai lớp resist: dưới là LOR-10B (lift-off), trên là OFPR-800 (resist tạo hình).

Bước 5. Gia nhiệt hai lớp resist

- Đặt wafer lên đế nhiệt ở nhiệt độ thích hợp (90–100 °C).

- Giữ trong 20 phút để làm khô hoàn toàn dung môi của cả hai lớp resist, ổn định cơ học, tránh chảy và làm mờ họa tiết trong bước quang khắc.

Bước 6. Quang khắc tạo họa tiết điện cực và đế gia nhiệt

- Lắp mặt nạ quang chứa các chi tiết điện cực và đế gia nhiệt lên mask holder, mặt mask quay xuống, gắn chắc trên kính 5×5 inch để đảm bảo phẳng và dễ thao tác.

- Trên hệ quang khắc, cài đặt liều UV 225 mJ/cm² và thời gian chiếu 6 s phù hợp với độ dày OFPR-800.

- Đặt wafer (Si/LOR/OFPR) lên giá của máy aligner, căn chỉnh cho trùng với mask bằng hệ thống quan sát hai mặt (UNICON Double View Mask Aligner PEM-800), rồi đóng khe hở và tiến hành chiếu.

- Ánh sáng UV chỉ xuyên qua những vùng trong suốt trên mask, làm phân hủy cấu trúc polymer của OFPR-800 tại đó, biến khu vực này thành phần dễ hòa tan trong developer.

Bước 7. Tráng rửa lớp LOR-10B và OFPR-800

- Sau chiếu, wafer được mang đến bồn tráng rửa. Trước hết, ngâm trong dung dịch developer NMD-3 (dùng cho LOR-10B) trong 16 s. Dung dịch này sẽ hòa tan phần LOR ở những vùng không được bảo vệ phù hợp, giúp tạo step dưới chân cấu trúc, hỗ trợ cho quá trình lift-off khi phủ kim loại. Sau đó rửa kỹ bằng nước Mi.Q chảy liên tục khoảng 10 phút để loại sạch NMD-3 và cặn resist.

- Tiếp theo, ngâm wafer trong dung dịch Remover 106 (developer của OFPR-800) trong 16 s; phần OFPR-800 không được chiếu (hoặc chiếu không đủ liều) sẽ bị hòa tan, để lại các vùng resist mô phỏng chính xác hình dạng điện cực/đế gia nhiệt như trên mask. Sau đó lại rửa kỹ với Mi.Q trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn hóa chất tráng rửa và cặn polymer.

Bước 8. Rửa, sấy khô và hoàn thiện khuôn

- Chuẩn bị ba khay sạch: một chứa developer “sạch” (hoặc dung dịch trung gian), một chứa IPA và một chứa nước khử ion.

- Wafer sau khi tráng rửa chính được nhúng nhanh vào khay developer sạch khoảng 10 s (nếu quy trình yêu cầu), tiếp theo chuyển sang khay IPA 10 s để thay thế dung dịch trên bề mặt, rồi sang khay nước khử ion 10 s để loại bỏ hoàn toàn vết dung môi hữu cơ.

- Cuối cùng thổi khô bằng khí nitrogen; bề mặt wafer lúc này chỉ còn lại những phần resist đã được quang hóa đúng theo hình điện cực và đế gia nhiệt, chuẩn bị cho các bước phủ kim loại và lift-off tiếp theo.

Toàn bộ các bước trên (đúc PDMS, xử lý plasma, quang khắc LOR/OFPR) đều gắn trực tiếp với mục tiêu cuối cùng là tạo hệ kênh vi lưu PDMS tích hợp điện cực và đế gia nhiệt, đảm bảo độ kín, độ bám dính và độ chính xác hình học cần thiết cho thí nghiệm vi lưu.

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

Chuẩn bị chung trước khi phủ:

- Kiểm tra tình trạng máy bốc bay/lắng đọng (nguồn RF, hệ bơm chân không, làm mát, đồng hồ áp suất, đồng hồ lưu lượng khí Ar).

- Chuẩn bị đế (substrate): cắt đúng kích thước, làm sạch bằng acetone → ethanol/IPA → sấy khô bằng N₂; rửa lại bằng DI water và sấy trên hot plate.

- Lắp đế lên giá giữ mẫu, cố định chắc chắn, đảm bảo mặt cần phủ hướng về bia (target) và ở vị trí quy định; lắp mask định hình vùng gia nhiệt/điện cực.

Giai đoạn 1. Tạo đế gia nhiệt Ti/Pt

Bước 1. Đưa mẫu vào buồng và tạo chân không

- Đưa giá mẫu vào buồng phủ, khóa nắp buồng.

- Khởi động hệ bơm chân không (bơm sơ cấp, sau đó bơm cao) cho đến khi áp suất đạt giá trị vận hành (thường $\sim 10^{-3}$ – 10^{-6} Torr tùy hệ). Giám sát trên đồng hồ áp suất, đảm bảo không có rò rỉ.

Bước 2. Làm sạch bề mặt bằng plasma Ar

- Mở van khí Ar, điều chỉnh lưu lượng đến 31 sccm theo đồng hồ lưu lượng.

- Kích hoạt nguồn RF, đặt công suất RF = 120 W để tạo plasma Ar.

- Thực hiện xử lý plasma trong thời gian 2 phút nhằm làm sạch bề mặt đế, tăng độ bám dính cho lớp Ti và Pt. Sau đó tắt RF.

Bước 3. Phủ lớp Ti (lớp bám dính)

- Chọn bia Ti trên bảng điều khiển, xoay tháp bia (nếu là hệ sputter) đến vị trí làm việc.

- Thiết lập lưu lượng Ar = 5,2 sccm; chờ áp suất trong buồng ổn định.

- Bật nguồn RF cho bia Ti, tăng dần đến công suất RF = 75 W, quan sát sự hình thành plasma.

- Sau khi plasma ổn định, mở shutter của bia Ti để bắt đầu phủ. Duy trì các điều kiện: RF 75 W, 5,2 sccm Ar trong 8 phút.

- Hết thời gian, đóng shutter, giảm công suất RF về 0, tắt nguồn Ti. Lớp Ti mỏng (lớp bám dính cho Pt) đã hình thành trên đế.

Bước 4. Phủ lớp Pt (lớp gia nhiệt)

- Xoay tháp bia sang bia Pt, kiểm tra lại vị trí mẫu và che chắn (mask).

- Điều chỉnh lưu lượng Ar xuống 4,8 sccm; chờ áp suất ổn định.

- Bật nguồn RF cho bia Pt, tăng đến công suất RF = 100 W, đảm bảo plasma ổn định, không tắt lửa.

- Mở shutter của bia Pt để tiến hành phủ. Giữ các thông số: RF 100 W, 4,8 sccm Ar trong 10 phút để đạt chiều dày Pt theo thiết kế để gia nhiệt.

- Kết thúc 10 phút, đóng shutter, giảm dần công suất RF về 0 và tắt nguồn Pt.

Bước 5. Kết thúc giai đoạn 1

Giữ buồng ở chân không thêm vài phút cho hệ nguội, sau đó xả khí để chuyển mẫu sang hệ khác.

- Xả khí buồng từ từ về áp suất khí quyển, mở nắp, tháo mẫu, kiểm tra sơ bộ bề mặt Ti/Pt.

Giai đoạn 2. Tạo điện cực vàng Ti/Au

Bước 1. Chuẩn bị mẫu và nguồn vật liệu

- Để sau khi đã có cấu trúc cần thiết được làm sạch nhẹ lại bằng khí N₂, tránh chạm tay trực tiếp lên bề mặt.

- Kiểm tra và nạp vật liệu Ti và Au vào boat/crucible của nguồn bốc bay; đảm bảo vật liệu đủ, không nhiễm bẩn, và có kết nối điện tốt.

Bước 2. Đưa mẫu vào buồng và tạo chân không

- Gắn mẫu lên giá giữ, đặt đúng hướng về nguồn bốc bay, khoảng cách nguồn mẫu đúng theo thiết kế; gắn mask để định hình vùng điện cực vàng.

- Đóng buồng và khởi động bơm chân không đến khi đạt áp suất yêu cầu cho bốc bay kim loại (thường 10⁻⁵–10⁻⁶ Torr).

- Bật hệ giám sát độ dày (QCM), cài đặt thông số vật liệu Ti và Au, đặt mục tiêu độ dày Ti = 5 nm, Au = 50 nm.

Bước 3. Bốc bay lớp Ti

- Chọn nguồn Ti trên bảng điều khiển.

- Tăng dần dòng gia nhiệt đến khoảng 11,3 A; đồng thời điều chỉnh chùm (hoặc dòng) khoảng 40 mA theo thông số đã hiệu chuẩn, theo dõi trên màn hình tốc độ bốc bay.

- Khi tốc độ bốc bay đạt khoảng 0,02 nm/s và ổn định, mở shutter để bắt đầu phủ Ti lên đế.

- Duy trì điều kiện: tốc độ 0,02 nm/s, dòng 11,3 A, 40 mA trong 5 phút; đồng thời theo dõi QCM. Khi hiển thị độ dày đạt ~5 nm, đóng shutter.

- Giảm dòng gia nhiệt về 0 và tắt nguồn Ti. Lớp Ti mỏng (5 nm) lúc này đóng vai trò lớp bám dính cho Au.

Bước 4. Bốc bay lớp Au

- Chuyển sang nguồn Au, kiểm tra lại vị trí mask và mẫu.

- Tăng dòng gia nhiệt đến khoảng 12 A, đặt dòng chùm/nguồn khoảng 80 mA, theo dõi đến khi tốc độ bốc bay đạt khoảng 0,06 nm/s và ổn định.

- Mở shutter, bắt đầu phủ Au với tốc độ 0,06 nm/s trong khoảng 15 phút; QCM phải tăng đều đến độ dày khoảng 50 nm.

- Khi đạt 50 nm Au (hoặc kết thúc 15 phút), đóng shutter, giảm dần dòng về 0 và tắt nguồn Au.



Hình 2.12. Hệ bốc bay để tạo lớp Au

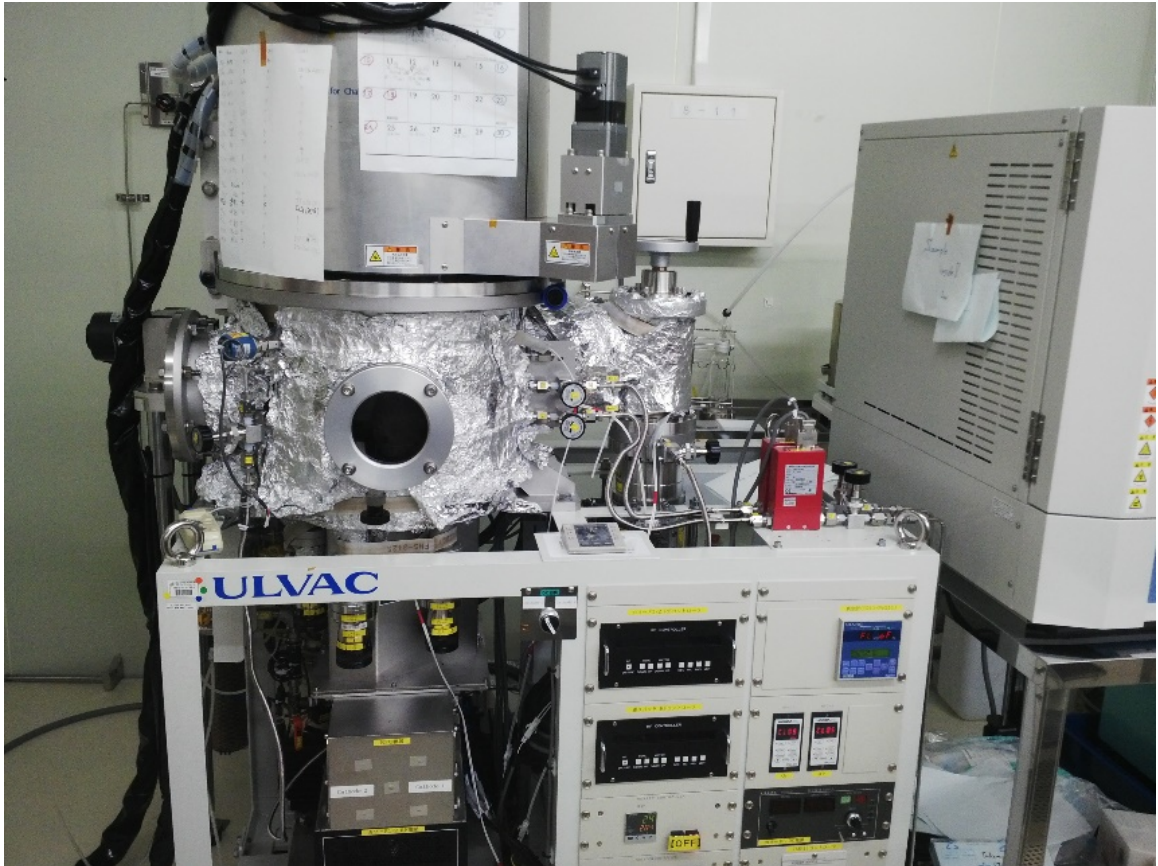
Bước 5. Kết thúc quá trình và lấy điện cực

- Giữ buồng ở chân không thêm một thời gian ngắn để các bộ phận nguội bớt, tránh sốc nhiệt cho mẫu.

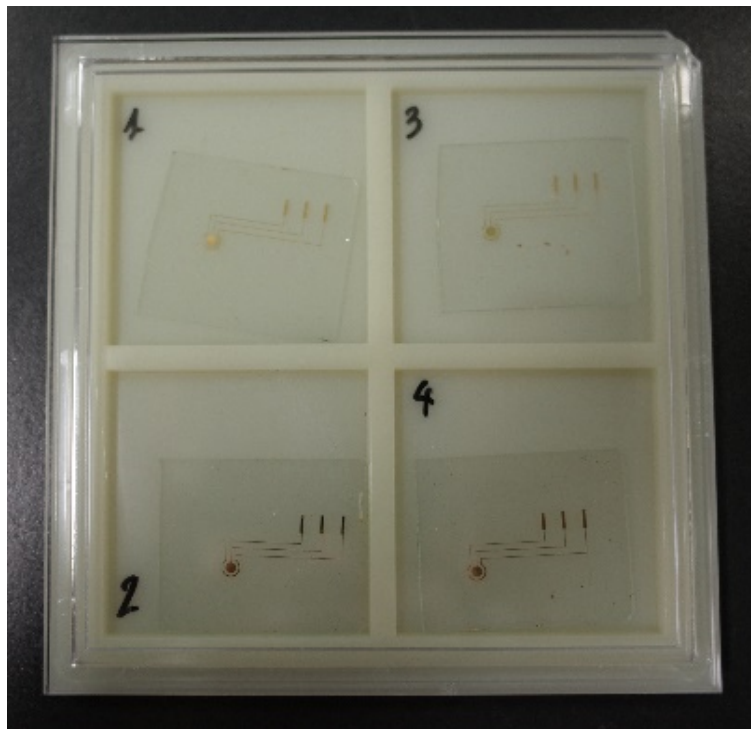
- Mở van xả khí từ từ cho đến khi áp suất bằng áp suất phòng, mở nắp buồng, tháo giá mẫu.

- Tháo mask để lộ vùng điện cực vàng với cấu trúc Ti (5 nm) / Au (50 nm). Kiểm tra bằng mắt/kính hiển vi quang xem lớp phủ đồng đều, không bong tróc, không bị “shadow” ngoài vùng mask.

- Ghi lại vào sổ vận hành: ngày, giờ, mã mẫu, loại đế, thông số từng lớp (RF, dòng, thời gian, tốc độ, độ dày), tình trạng máy, ghi chú bất thường nếu có.



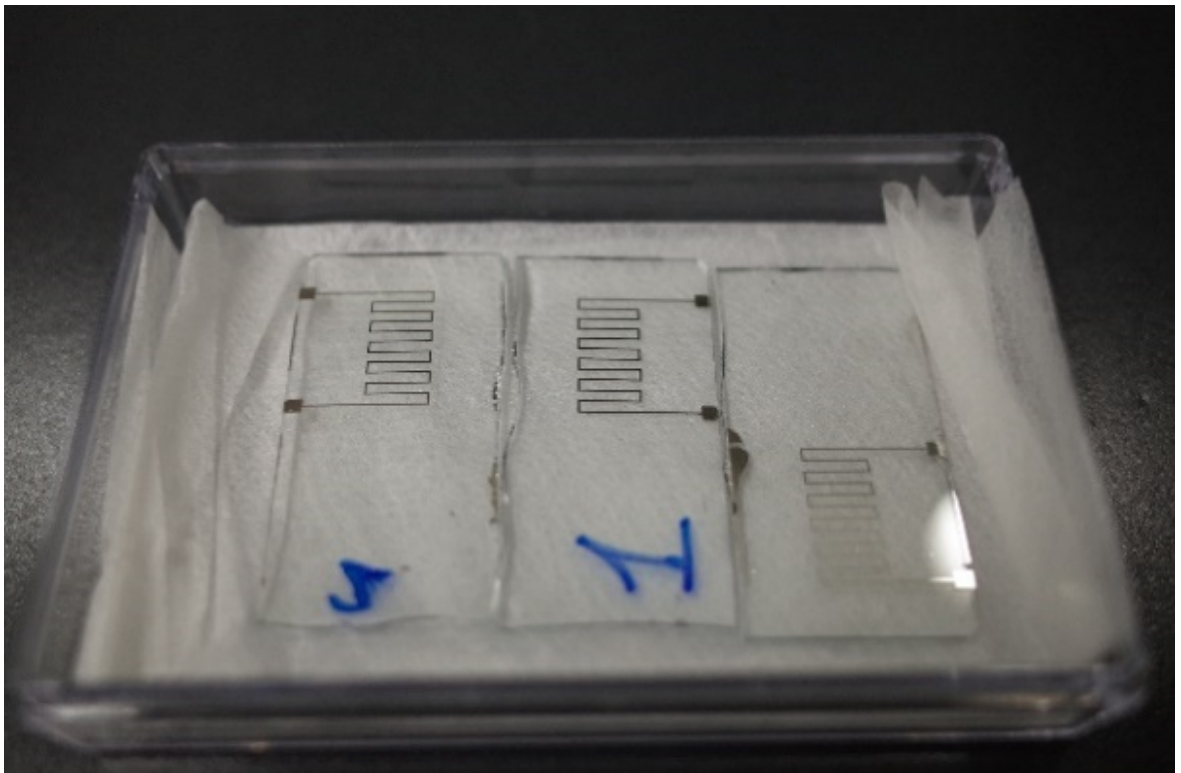
Hình 2.13. Hệ bốc bay ULVAC dùng để tạo lớp Pt



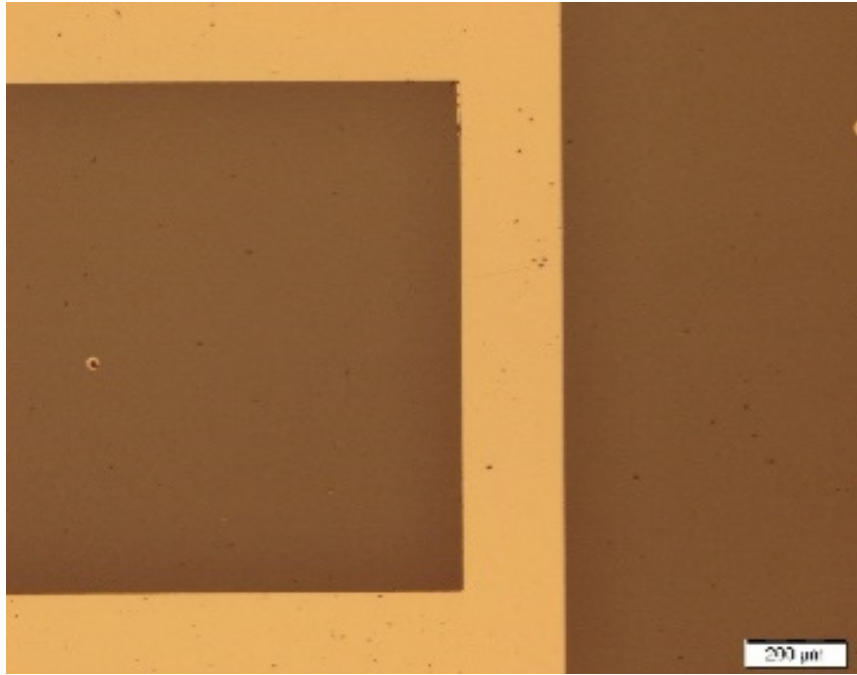
Hình 2.14. Điện cực vàng sau khi chế tạo



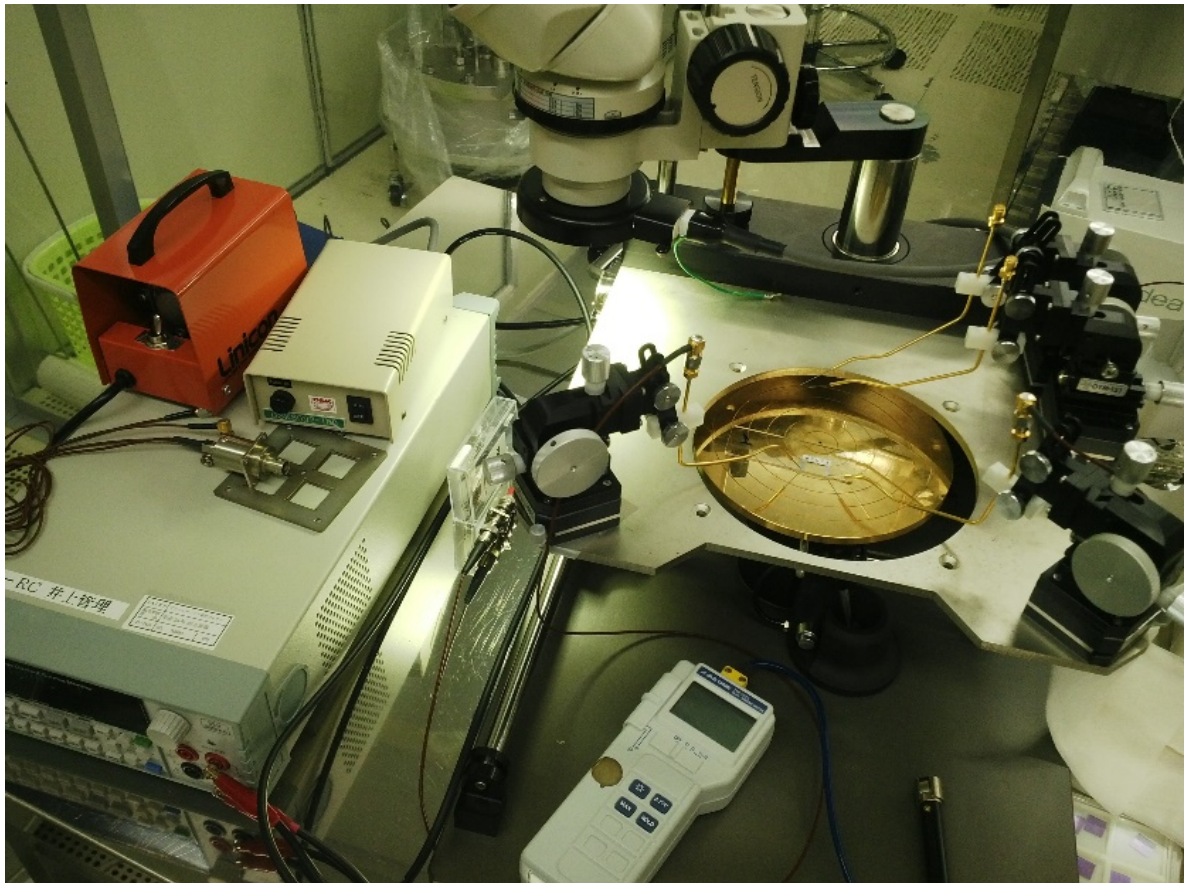
Hình 2.15. Ảnh chụp điện cực vàng từ kính hiển vi điện tử



Hình 2.16. Đốt nhiệt Pt sau khi chế tạo



Hình 2.17. Ảnh chụp đế nhiệt platin từ kính hiển vi điện tử



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

Điện cực sau khi được chế tạo xong sẽ được kiểm tra khả năng hoạt động với hệ 4 đầu dò. Đế 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.

Đặt wafer hoặc chip chứa đế nhiệt lên bàn probe station, cố định sao cho bề mặt điện cực hướng lên và nằm trong vùng quan sát của kính hiển vi. Kiểm tra các đầu dò (probe): đầu kim sạch, cố định chắc trên tay dò, dây tín hiệu/nối đất tốt, không bị đứt hoặc lỏng. Kết nối hệ 4 đầu dò với nguồn cấp dòng/nguồn DC và máy đo điện áp (hoặc một sourcemeter có thể đo đồng thời I–V); chuẩn bị thêm một cảm biến nhiệt độ bề mặt (ví dụ thermocouple gắn vào trung tâm đế) nếu muốn hiệu chuẩn nhiệt độ.

Xác định hai pad ngoài cùng của đế nhiệt dùng để cấp dòng (I^+ , I^-) và hai pad nằm giữa dùng để đo điện áp rơi (V^+ , V^-); bố trí kiểu “4-point probe” giúp đo chính xác điện trở của phần đế nhiệt mà không bị ảnh hưởng điện trở dây, tiếp xúc. Dưới kính hiển vi, lần lượt hạ từng đầu dò xuống bề mặt pad:

- Điều chỉnh vị trí thô sao cho đầu kim nằm ngay trên pad.
- Sau đó hạ từ từ đến khi đầu kim vừa chạm và tạo tiếp xúc điện tốt nhưng không làm xước hoặc phá hủy pad.

Kiểm tra nhanh bằng phép đo thông mạch hoặc đo điện trở nhỏ với dòng rất nhỏ để đảm bảo cả 4 đầu dò tiếp xúc ổn định.

Đặt nguồn dòng ở chế độ quét dòng thấp (ví dụ vài mA) hoặc cấp một dòng cố định nhỏ; nối hai đầu cấp dòng tới I^+ , I^- và đo điện áp rơi giữa V^+ , V^- . Tính điện trở ở nhiệt độ phòng $R_0 = V/IR_0 = V/I$; giá trị này là mốc để so sánh khi gia nhiệt.

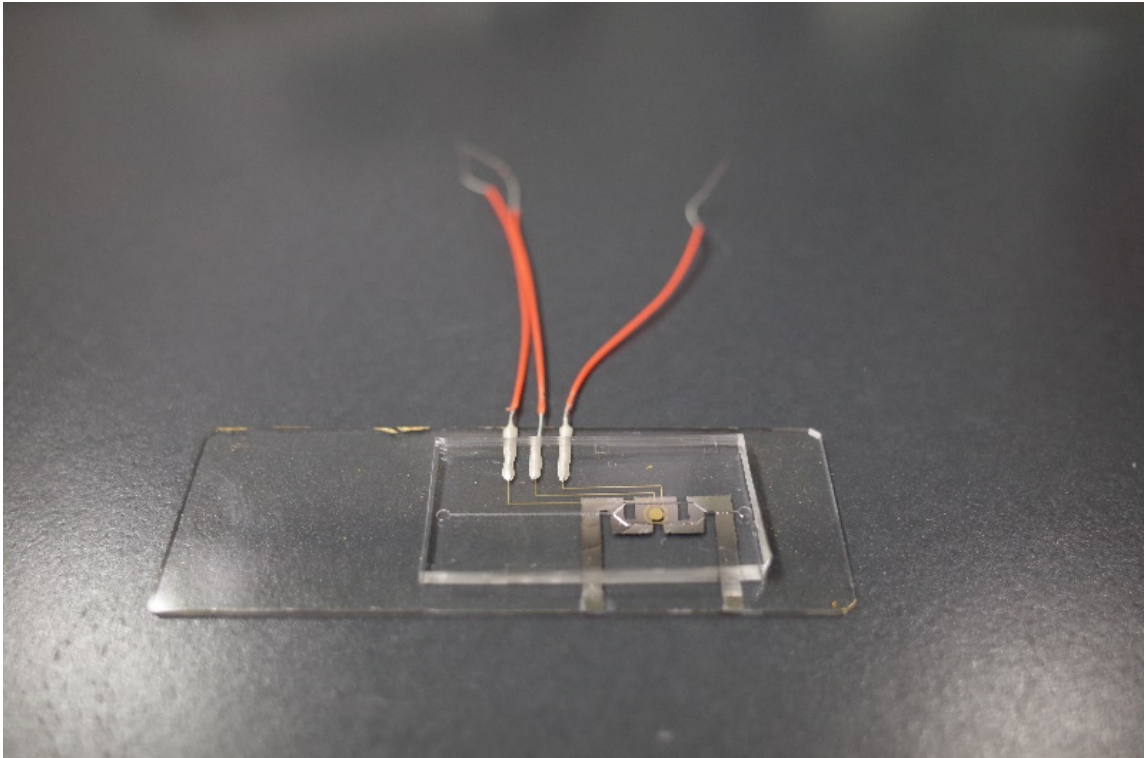
Tăng dần dòng qua đế nhiệt (ví dụ theo các bước 5 mA, 10 mA, 15 mA... hoặc theo thiết kế) và với mỗi mức dòng, đo điện áp rơi giữa hai đầu dò điện áp. Điện trở tại từng mức được tính bởi $R = V/IR = V/I$. Khi dòng tăng, công suất tỏa nhiệt $P = I^2R$ làm đế nóng lên; với vật liệu có hệ số nhiệt điện trở dương, R sẽ tăng theo nhiệt độ. Nếu có cảm biến nhiệt độ gắn trên đế, ghi đồng thời giá trị nhiệt độ để xây dựng đường đặc tuyến R–T; điều này cho phép dùng chính điện trở làm “cảm biến nhiệt” trong các thí nghiệm sau.

Vẽ đồ thị R theo I hoặc R theo P (hay theo nhiệt độ nếu đo được). Vùng làm việc mong muốn là nơi R tăng đều, không xuất hiện trôi bất thường, không có dấu hiệu hỏng (như R tăng đột ngột hoặc giảm mạnh). Xác định dòng tối đa mà tại đó đế vẫn hoạt động ổn định, không bị cháy hay đứt mạch; thông thường sẽ dừng quét khi thấy R bắt đầu tăng rất nhanh hoặc nhiệt độ đạt giá trị giới hạn thiết kế.

Nếu điện trở tăng đều với dòng/nhiệt độ và trở về giá trị gần R_0 khi tắt dòng cho thấy đế nhiệt hoạt động tốt, không bị trễ nhiệt hay hư hỏng vĩnh viễn. So sánh độ dốc đường R–T (hoặc R–P) với thiết kế hoặc mô phỏng để đánh giá hiệu quả gia nhiệt

và độ nhạy nhiệt điện trở. Nếu có nhiều đế, lặp lại đo trên vài mẫu để kiểm tra độ lặp lại giữa các chip.

Lưu lại toàn bộ dữ liệu I–V, R–T, hình ảnh bố trí đầu dò và điều kiện môi trường (nhiệt độ phòng, áp suất...). Sau khi đo, nâng từng đầu dò lên theo thứ tự, tránh cạ ngang làm xước pad; tháo wafer, vệ sinh nhẹ bề mặt nếu cần. Ghi chú trong sổ thí nghiệm: mã đế nhiệt, ngày đo, cấu hình 4 đầu dò, dải dòng sử dụng, hiện tượng đặc biệt (nếu có) để làm cơ sở cho các thí nghiệm vi lưu hoặc cảm biến tích hợp sau này.



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

2.3.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.4.1. Quang khắc (lithography)

Quang khắc là phương pháp dùng ánh sáng (UV) để chuyển họa tiết từ mặt nạ quang (photomask) xuống lớp cản quang (photoresist) trên bề mặt đế (wafer). Mục tiêu là tạo ra các vùng được bảo vệ và không được bảo vệ, từ đó ăn mòn hoặc phủ vật liệu theo hình mong muốn trên nền vi mạch hay khuôn vi lưu. Các bước cơ bản:

Phủ cản quang

- + Làm sạch đế (Si, thủy tinh, kim loại phủ sẵn...) để loại bụi và dầu.
- Quay phủ (spin coating) lớp cản quang dương hoặc âm đến bề dày yêu cầu; sau đó sấy “soft-bake” để bay dung môi, ổn định màng.

Căn chỉnh và chiếu sáng

- Lắp wafer vào mask aligner, đặt mặt nạ quang chứa họa tiết lên trên.
- Căn chỉnh sao cho họa tiết trên mask trùng với vị trí cần tạo trên wafer (có thể căn nhiều lớp).
- Chiếu tia UV với liều xác định; với căn quang dương vùng chiếu sẽ dễ hòa tan trong developer, với căn quang âm thì vùng chiếu sẽ được trùng hợp và bền hơn.

Tráng rửa (develop) và các bước bổ sung

- Ngâm wafer trong dung dịch tráng rửa, loại bỏ phần cản quang đã bị hoặc chưa bị quang hóa tùy loại resist, thu được hình cản quang giống với họa tiết mask.
- Dùng lớp cản quang này làm mặt nạ cho các bước tiếp theo: ăn mòn ướt/khô, bóc bay kim loại rồi lift-off, khắc sâu tạo kênh SU-8,... Sau cùng có thể strip (tẩy) toàn bộ cản quang.

2.3.4.2. Đo điện trở bằng phương pháp 4 đầu dò (Four-point probe)

Phương pháp 4 đầu dò dùng bốn tiếp điểm riêng biệt: hai tiếp điểm ngoài cấp dòng, hai tiếp điểm trong đo điện áp. Cách bố trí này loại bỏ ảnh hưởng điện trở dây dẫn và tiếp xúc, cho phép đo chính xác điện trở tấm hoặc điện trở suất của lớp kim loại/màng mỏng.

Cấu hình 4 đầu dò

- Hai đầu dò ngoài nối với nguồn dòng DC (hoặc AC nhỏ), hai đầu dò trong nối với von kế có trở kháng rất lớn.
- Dòng I chạy qua lớp vật liệu theo cặp ngoài, trong khi von kế gần như không kéo dòng nên điện áp đo được chỉ phản ánh đúng sụt áp nội tại của vùng giữa hai đầu dò trong.

Tiến hành đo

- Ép nhẹ bốn đầu kim lên bề mặt màng kim loại hoặc bán dẫn, bảo đảm tiếp xúc điện tốt.
- Cấp dòng ổn định I (có thể quét nhiều giá trị) qua hai đầu ngoài, đo điện áp V giữa hai đầu trong.
- Điện trở đoạn mẫu là $(R = V/I)$; với thiết kế hình học biết trước hoặc với hệ số hiệu chỉnh (prober kèm theo) có thể tính ra điện trở tấm (sheet resistance, Ω) hoặc điện trở suất ρ của vật liệu.

Ứng dụng

- Đo độ dày/điện trở tấm của màng kim loại sau sputtering hoặc evaporation.
- Theo dõi sự thay đổi điện trở theo nhiệt độ (R-T) để đánh giá hệ số nhiệt điện trở hoặc kiểm tra hoạt động của đế nhiệt, như bạn đang làm.

2.3.4.3. Bốc bay nhiệt trong chân không và bốc bay nhiệt chùm điện tử

Cả hai đều thuộc nhóm lắng đọng hơi vật lý (PVD), dùng để phủ màng mỏng kim loại (Ti, Au, Pt...) trong môi trường chân không cao. Điểm khác nhau là cách cung cấp năng lượng để làm bay hơi vật liệu.

Bốc bay nhiệt trong chân không (thermal evaporation):

Vật liệu cần phủ (kim loại) được đặt trong thuyền (boat) hoặc sợi dây vonfram, được nung nóng bằng dòng điện đến nhiệt độ cao vượt qua điểm bay hơi. Trong chân không, nguyên tử/hơi kim loại bốc ra theo đường gần thẳng, ngưng tụ lên bề mặt đế phía trên, tạo thành màng mỏng.

Quy trình cơ bản

- Nạp vật liệu vào boat, gắn đế lên holder, đóng buồng và bơm đến áp suất $\sim 10^{-5}$ – 10^{-6} Torr.

- Tăng dần dòng qua boat đến khi vật liệu chảy và bốc hơi; dùng cảm biến tinh thể thạch anh (QCM) để theo dõi tốc độ bốc bay và độ dày màng.

- Khi đạt tốc độ ổn định, mở shutter để phủ; đến khi đủ độ dày thì đóng shutter, tắt dòng, chờ nguội rồi xả khí lấy mẫu.

Đặc điểm

- Thiết bị đơn giản, thích hợp cho nhiều kim loại có nhiệt độ nóng chảy vừa phải.

- Dòng nguyên tử tương đối định hướng (line-of-sight), dễ tạo lớp phủ đồng đều trên bề mặt phẳng; tuy nhiên khó phủ đồng đều trên bề mặt 3D phức tạp.

Bốc bay nhiệt chùm điện tử (electron-beam evaporation):

Dùng chùm electron được gia tốc (thường vài kV) quét lên bề mặt “crucible” chứa vật liệu; năng lượng của electron chuyển thành nhiệt, làm vùng bị chiếu nóng chảy và bay hơi. Vì chỉ vùng nhỏ bị nung, có thể bốc bay các vật liệu có nhiệt độ nóng chảy rất cao (W, Pt, TiO₂,...) mà không làm hỏng toàn bộ lò chứa.

Quy trình cơ bản

- Bơm chân không cao (thường vào khoảng hơn 10^{-6} Torr) để tránh tán xạ electron và ôxi hóa vật liệu.

- Thiết lập dòng và điện áp chùm electron, căn tiêu điểm vào bề mặt mẫu đích; khi chùm đủ mạnh, vật liệu bắt đầu nóng chảy và bay hơi.

- Dùng QCM theo dõi tốc độ lắng đọng, mở/đóng shutter tương tự bốc bay nhiệt trong chân không để điều khiển độ dày. Có thể quét chùm electron để phân bố nhiệt đều trên mẫu.

Đặc điểm

- Cho phép phủ vật liệu nhiệt độ nóng chảy cao, độ tinh khiết màng tốt vì nguồn nhiệt tập trung.

- Thiết bị phức tạp hơn, cần điều khiển chùm electron, có thể sinh tia X làm hư hại một số vật liệu nhạy cảm nếu không tối ưu thông số.

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

MB là phân tử mang điện tích dương, có khả năng xen cài (intercalate) hoặc gắn tĩnh điện vào rãnh nhỏ của DNA sợi đôi (dsDNA). Khi xen cài, tâm oxy hóa-khử của MB nằm gần khung base của DNA, nhưng vẫn giữ được hoạt tính điện hóa trên điện cực, nên có thể dùng như “nhãn” redox cho dsDNA. Một số chất chỉ thị khác như Hoechst 33258, phức kim loại hay hệ osmium redox cũng gắn được với DNA và cho tín hiệu tốt, nhưng thường cần cố định lên bề mặt điện cực hoặc có xu hướng ức chế enzym polymerase, làm giảm/biến dạng quá trình khuếch đại LAMP.

MB, với nồng độ tối ưu, không cần gắn cố định, chỉ cần cho trực tiếp vào dung dịch phản ứng; nó vừa xen cài được tốt, vừa không làm giảm đáng kể hoạt tính của polymerase, nên phù hợp cho theo dõi LAMP thời gian thực trong cùng một thể tích phản ứng. Điều này giúp phép đo điện hóa phản ánh đúng sự thay đổi lượng dsDNA mà không bị nhiễu bởi hiệu ứng ức chế enzyme.

Yêu cầu về độ ổn định nhiệt điện hóa

Khi sử dụng phương pháp LAMP, phản ứng tiến hành ở khoảng 60–65°C trong thời gian dài; vì vậy đầu dò redox phải ổn định cả về hoá học lẫn điện hóa trong điều kiện nhiệt độ cao và pH sinh lý (pH ~7,4).

Nếu MB bị phân hủy, bị hấp phụ không thuận nghịch lên điện cực hoặc thay đổi trạng thái oxy hóa-khử chỉ do nung nóng (không liên quan đến DNA), tín hiệu dòng sẽ trôi theo thời gian và không còn phản ánh chính xác quá trình khuếch đại. Do đó, trước khi dùng MB như đầu dò cho LAMP thời gian thực, cần chứng minh rằng tín hiệu MB ít thay đổi khi ủ ở 63°C trong môi trường giống với phản ứng.

Thiết lập thí nghiệm kiểm tra độ bền nhiệt

Dung dịch MB được chuẩn bị trong nước khử ion (DI) ở nồng độ 20 μM . Nồng độ này được lựa chọn như một điểm tối ưu:

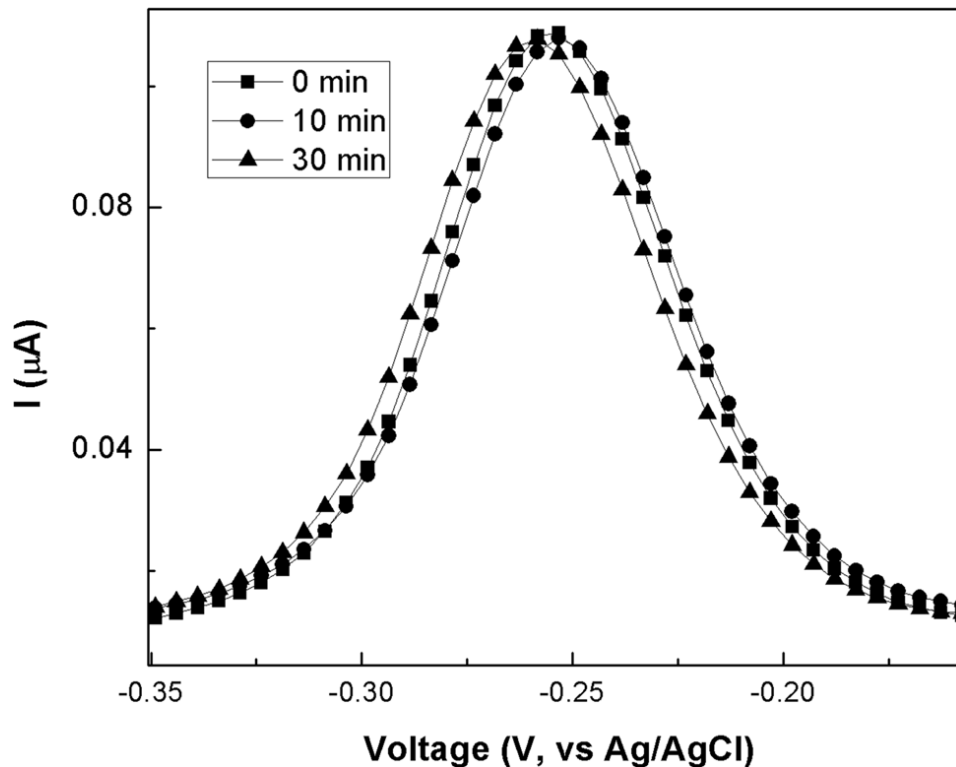
- Đủ cao để tạo dòng đo được rõ ràng bằng SWV (khoảng 1 μA).
- Đủ thấp để không gây ức chế quá trình LAMP và không làm bám dính mạnh lên điện cực, tránh fouling.

Dung dịch MB được giữ ở 63°C, pH ~7,4 trong các khoảng thời gian khác nhau (0, 10, 30 phút...), sau đó đo bằng SWV trên cùng loại điện cực như sẽ dùng trong hệ LAMP–EC–MF. Mục tiêu là xem biên độ dòng cực đại có thay đổi đáng kể theo thời gian ủ hay không.

Trong hình 3.1 trục hoành biểu diễn thế điện (V, so với Ag/AgCl), trục tung là dòng (μA). Ba đường cong tương ứng với thời gian ủ dung dịch MB tại 63°C là 0, 10 và 30 phút. Cả ba đường đều có một đỉnh đối xứng nằm khoảng $-0,25$ V; đây là thế khử/oxy hóa đặc trưng của MB trên điện cực trong điều kiện thí nghiệm. Việc vị trí đỉnh gần như không dịch chuyển chứng tỏ môi trường hoá học (pH, ion) và trạng thái bề mặt điện cực không thay đổi đáng kể sau khi nung.

Chiều cao đỉnh của ba đường gần như trùng nhau (khác biệt chỉ rất nhỏ, trong khoảng $\pm 5\%$). Điều này có nghĩa là số lượng phân tử MB “điện hóa hoạt động” tại bề mặt điện cực hầu như không thay đổi sau 10 hay 30 phút ủ ở 63 °C. Nếu quy đổi sang dòng cực đại, ta có thể coi tín hiệu nằm quanh giá trị trung bình khoảng 0,11–0,12 μA , với dao động tương đối nhỏ hơn 5% giữa các thời điểm. Như vậy:

- Không có dấu hiệu MB bị phân hủy, bị oxy hóa quá mức hay bị hấp phụ không thuận nghịch lên điện cực trong thời gian ủ.
- Tín hiệu SWV chỉ phụ thuộc vào nồng độ MB (và sau này là trạng thái gắn với DNA), chứ không phụ thuộc vào thời gian nung trong vùng nhiệt độ LAMP.



Hình 3.1. Độ bền nhiệt của hoạt tính oxy hóa khử xanh metylen.

Kết luận rút ra từ thử nghiệm

Thử nghiệm cho thấy hoạt tính oxy hóa-khử của MB ổn định về mặt nhiệt trong điều kiện giống với phản ứng LAMP (pH 7,4; 63 °C; thời gian tới ít nhất 30 phút), với độ lệch dòng đỉnh chỉ khoảng $\pm 5\%$.

Do đó, khi tích hợp MB vào hệ LAMP–EC–MF để theo dõi khuếch đại HBV theo thời gian thực, mọi thay đổi đáng kể của tín hiệu dòng đều có thể quy cho sự thay đổi lượng dsDNA (MB xen cài nhiều hay ít), chứ không phải do sự trôi nền của chính đầu dò MB.

Kết luận này xác nhận rằng xanh methylen là chất xen cài thích hợp cho hệ LAMP thời gian thực: vừa không ức chế đáng kể quá trình khuếch đại, vừa đảm bảo độ ổn định điện hóa đủ cao để phân tích định lượng chính xác trong toàn bộ chu trình phản ứng.

3.1.2. Phát hiện HBV thời gian thực

3.1.2.1. Cơ chế tác động của methylene blue trong phản ứng LAMP

MB là chất màu mang điện tích dương, có khả năng xen cài (intercalate) hoặc gắn tĩnh điện vào rãnh nhỏ của DNA sợi kép giàu cặp base G–C. Ở trạng thái tự do trong dung dịch, MB khuếch tán dễ dàng đến bề mặt điện cực, trao đổi electron nhanh (khử/oxy hoá) nên cho tín hiệu dòng lớn trong SWV. Khi phản ứng LAMP tiến triển, lượng DNA sợi kép tăng rất nhanh; MB bị gắn ngày càng nhiều vào khung phosphate âm của DNA và/hoặc xen cài giữa các base, khiến:

- Hệ số khuếch tán hiệu dụng của MB giảm;
- Khoảng cách từ tâm redox của MB đến bề mặt điện cực tăng.

→ Hằng số chuyển electron giảm, nên dù tổng lượng MB không đổi, phần “điện hoá hoạt động” bị giảm, dẫn đến dòng đo được giảm.

3.1.2.2. Phân tích đường cong SWV (hình a)

Mỗi đường cong SWV biểu diễn quan hệ dòng – thế của MB tại một thời điểm cố định của phản ứng (0, 10, 20, 30 phút). Tất cả đều có đỉnh ở khoảng $-0,27$ V so với Ag/AgCl, phù hợp với thế khử đặc trưng của MB trên điện cực carbon/vàng trong dung dịch đệm.

Việc thế đỉnh gần như không dịch chuyển cho thấy môi trường hoá học (pH, nền điện ly) và trạng thái bề mặt điện cực ổn định; MB vẫn tham gia cùng một cặp phản ứng redox, chỉ khác về số lượng “MB hoạt động” tại bề mặt.

So sánh chiều cao đỉnh:

- 0 phút: đỉnh cao nhất ($\sim 1,3 \mu\text{A}$) \rightarrow gần như toàn bộ MB ở dạng tự do (chưa có sản phẩm LAMP đáng kể).

- 10 phút: đỉnh giảm rõ nhưng vẫn khá lớn \rightarrow đã có lượng sản phẩm DNA sinh ra, một phần MB bị gắn lên DNA, tuy nhiên phản ứng vẫn đang ở pha tăng tốc.

- 20 phút: đỉnh thấp hơn nhiều \rightarrow DNA tích lũy mạnh, phần lớn MB đã gắn với sản phẩm, chỉ còn một phần nhỏ tự do.

- 30 phút: đỉnh thấp nhất ($\sim 0,65 \mu\text{A}$) trong dải bạn đo \rightarrow phản ứng đã đi vào pha “plateau” hoặc gần bão hoà, lượng MB tự do đạt mức cân bằng thấp.

Hình dạng đỉnh vẫn đối xứng và nền phẳng cho thấy không xuất hiện phản ứng phụ mạnh hoặc fouling nghiêm trọng của điện cực trong khoảng thời gian đo.

3.1.2.3. Phân tích đồ thị $I-t$ (hình b)

Đồ thị này là phép “chiết” dữ liệu: lấy dòng đỉnh I từ các phổ SWV tại từng thời điểm và vẽ theo thời gian. Đường $I-t$ giảm gần tuyến tính từ 0 đến 20 phút rồi dốc giảm chậm hơn 20–30 phút. Điều này có thể gắn với động học LAMP:

- 0–20 phút: pha log; phản ứng LAMP nhân bản cực nhanh theo kiểu chu kỳ vòng lặp, số bản sao DNA tăng theo hàm mũ \rightarrow tốc độ “bắt” MB tăng nhanh, vì vậy dòng giảm mạnh.

- 20–30 phút: pha bão hoà; dNTP, primer hoặc enzyme dần cạn, sản phẩm tích tụ nhiều \rightarrow tốc độ sinh thêm DNA giảm, lượng MB bổ sung gắn thêm mỗi đơn vị thời gian ít hơn \rightarrow độ dốc $I-t$ nhỏ lại.

Nếu tiếp tục đo tới 60 phút, dự kiến I sẽ tiệm cận một giá trị nền thấp; khi đó gần như mọi MB đã gắn vào DNA hoặc phân bố lại theo cân bằng mới.

3.1.2.4. Ý nghĩa định lượng và cách khai thác

Với mẫu dương (có DNA đích), ta thấy độ giảm dòng $\Delta I = I(0) - I(t)$ tăng theo thời gian. Với mẫu âm (không DNA đích), ΔI gần như bằng 0 vì không có sản phẩm để “giữ” MB.

Độ giảm dòng tại một thời điểm cố định (ví dụ 20 hoặc 30 phút) tỉ lệ thuận với lượng sản phẩm DNA, mà sản phẩm DNA lại tỉ lệ – theo mô hình LAMP – với log nồng độ DNA ban đầu. Do đó, ta có thể:

- Chuẩn bị một loạt mẫu chuẩn với nồng độ DNA đầu vào khác nhau.

- Chạy LAMP + SWV cùng điều kiện, lấy $I(t)$ tại thời điểm tối ưu (nơi độ tách biệt tín hiệu tốt nhất, thường là 20–30 phút).

- Vẽ đường chuẩn $\log(C_{DNA}) - \Delta I$ để định lượng nồng độ DNA ban đầu trong các mẫu chưa biết.

Ưu điểm của cách này là không cần thuốc nhuộm huỳnh quang hay thiết bị quang học; toàn bộ thông tin lấy từ tín hiệu điện hoá.

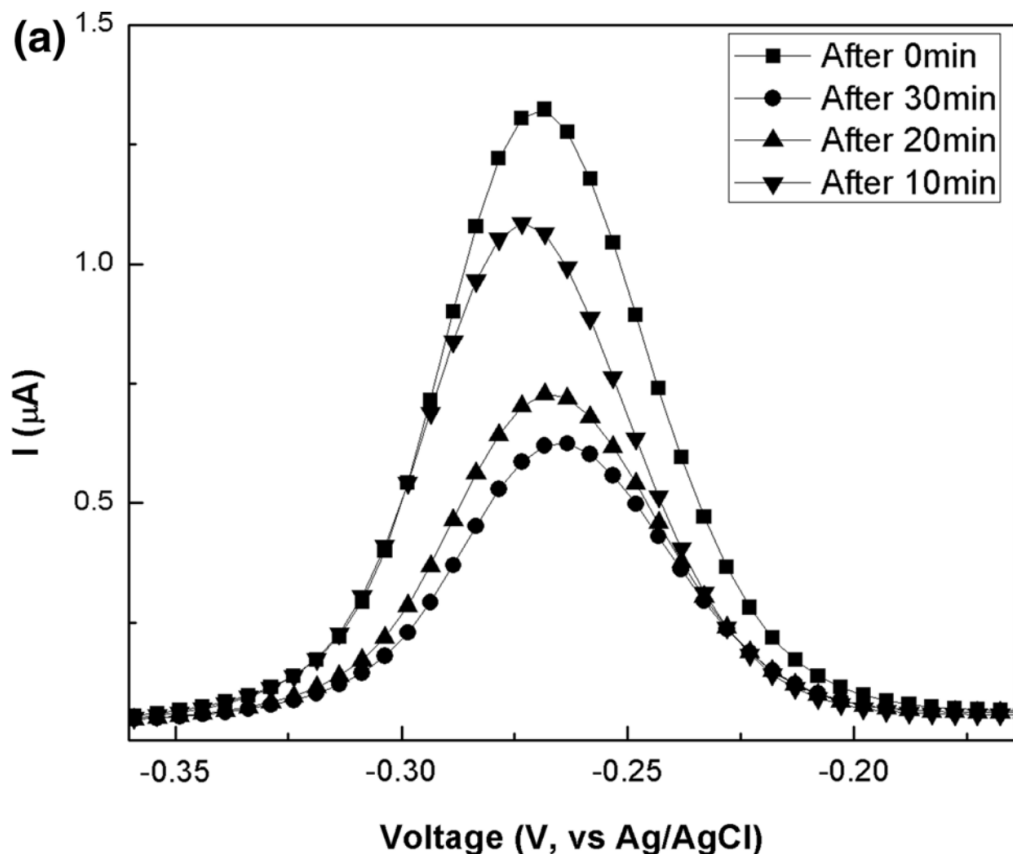
3.1.2.5. Kiểm soát nhiễu và xác nhận cơ chế

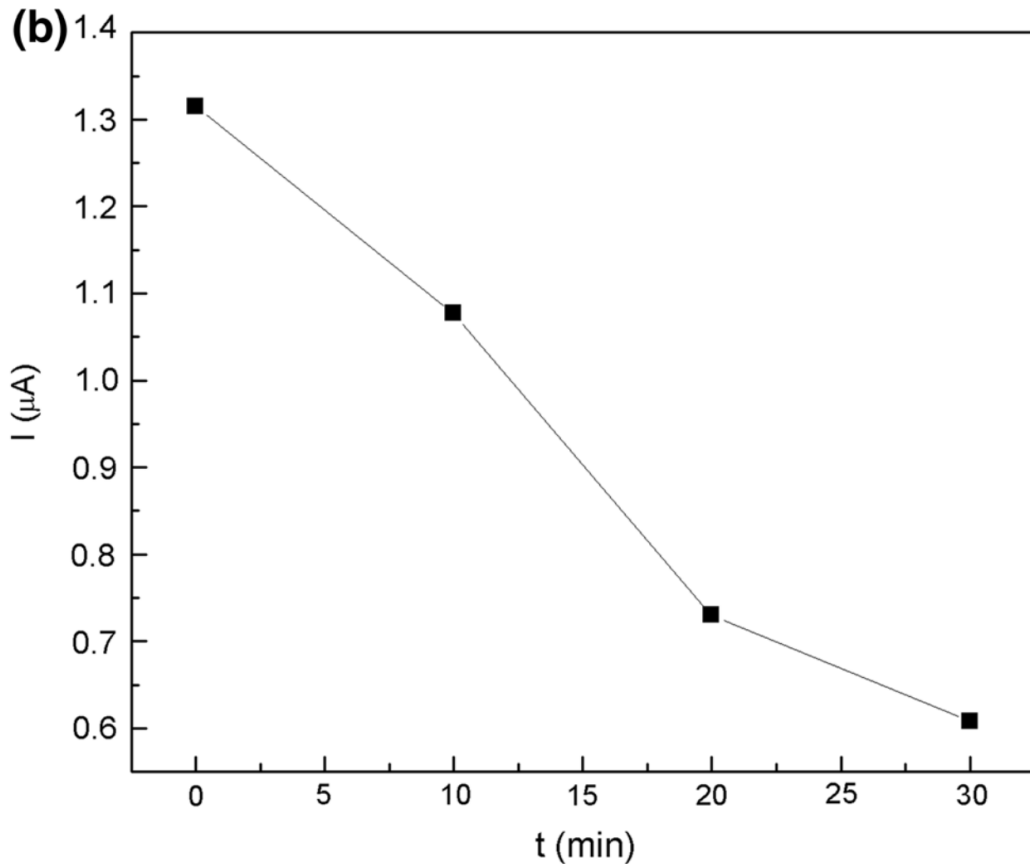
Để kết luận vững chắc hơn, cần thực hiện thêm một số thí nghiệm như sau:

Mẫu trắng không template (NTC): chạy LAMP không DNA đích nhưng có MB. Nếu đường $I-t$ gần như nằm ngang, ta khẳng định sự giảm dòng ở mẫu dương là do khuếch đại DNA, không phải do phân huỷ MB hay bám bản điện cực.

Mẫu DNA đã xử lý nuclease: cho thấy nếu phá huỷ sản phẩm DNA sau phản ứng, dòng MB sẽ tăng lại gần mức ban đầu, củng cố chứng cứ rằng MB chủ yếu bị “giữ” bởi DNA.

Lặp lại nhiều lần: tính sai số chuẩn của $I(0)$, $I(10)$, $I(20)$, $I(30)$; nếu RSD nhỏ (<5–10%), hệ đo đủ độ lặp lại để dùng trong phân tích định lượng/tham chiếu chẩn đoán.





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

Trong đó, (a) Đường cong SWV được đo ở các thời điểm phản ứng khác nhau (0 phút, 10 phút, 20 phút và 30 phút); (b) cường độ dòng điện là hàm của thời gian phản ứng. Mật độ dòng điện giảm liên tục trong quá trình khuếch đại đẳng nhiệt. Đáp ứng của MB được đo bằng SWV với biên độ xung 1 mV, tần số 12.5 Hz và độ rộng xung 5 mV.

Hệ biochip LAMP–điện hóa vi lưu trong nghiên cứu này cho phép phát hiện và định lượng HBV theo thời gian thực với lượng mẫu rất nhỏ, nhờ kết hợp đồng thời ưu điểm của vi kênh PDMS, khuếch đại đẳng nhiệt và đầu dò redox hòa tan.

Buồng phản ứng LAMP được tích hợp trong kênh vi lưu có thể tích rất nhỏ, nên khi đưa mẫu và thuốc thử vào, toàn bộ hỗn hợp được gia nhiệt nhanh và đồng đều đến nhiệt độ tối ưu của LAMP. Thể tích nhỏ làm nồng độ sản phẩm DNA tăng nhanh hơn so với ống phản ứng thông thường, từ đó làm thay đổi trạng thái gắn của methylene blue (MB) rõ rệt chỉ với một lượng mẫu đầu vào thấp; đây là yếu tố then chốt giúp chip đạt giới hạn phát hiện HBV thấp trong thời gian ngắn, phù hợp chẩn đoán cả ở giai đoạn nhiễm tiềm ẩn khi tải lượng virus rất thấp.

LAMP diễn ra ở nhiệt độ cố định, không cần chu trình nhiệt, nên cấu trúc chip chỉ cần một đế nhiệt đơn giản bên dưới buồng vi lưu. Trong suốt quá trình khuếch đại, MB hoà tan xen cài vào dsDNA mới sinh ra; phần MB “tự do” giảm dần làm dòng điện hoá đo được trên điện cực giảm tương ứng. Bằng cách thực hiện các phép đo xung vuông định kỳ trong cùng một buồng phản ứng, có thể ghi lại đường cong tín hiệu theo thời gian và suy ra động học khuếch đại HBV theo thời gian thực, thay cho việc mở ống lấy mẫu từng thời điểm như phương pháp truyền thống.

MB được dùng trực tiếp trong dung dịch phản ứng như một đầu dò oxy hóa khử “không gắn nhãn”, không cần cố định lên bề mặt điện cực hay gắn hóa trị vào DNA. Cách tiếp cận pha lỏng này loại bỏ nhiều bước xử lý bề mặt (chức năng hóa, cố định đầu dò, rửa), giảm nguy cơ mất hoạt tính sinh học và nhiễm bẩn; đồng thời, vì đầu dò phân bố đồng đều trong toàn bộ thể tích buồng vi lưu nên tín hiệu điện hóa thu được phản ánh trung thực tổng lượng dsDNA trong phản ứng, góp phần tăng độ chính xác định lượng HBV.

Thiết bị gồm hai phần tách rời: nền cảm biến (điện cực, đế nhiệt) và nắp/kênh PDMS; sau khi đo, hai phần có thể tháo ra, rửa bằng nước và ethanol rồi lắp lại, gắn kín lại bằng một lớp PDMS lỏng, cho phép tái sử dụng nhiều lần mà vẫn giữ được đặc tính vi lưu và điện hóa. Vì trên chip không cố định bất kỳ thành phần sinh học đặc hiệu nào, chỉ cần thay bộ môi LAMP thích hợp là có thể dùng cùng một nền biochip để phát hiện các mầm bệnh khác (ví dụ HBV, sốt rét, tác nhân gây bệnh từ thực phẩm), vẫn với ưu điểm dùng rất ít mẫu, khuếch đại đẳng nhiệt trong vi kênh và theo dõi tín hiệu điện hóa pha lỏng theo thời gian thực.

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

Phát hiện huỳnh quang và hình ảnh điện di trên gel của sản phẩm LAMP sau khi kết thúc khuếch đại được so sánh với phân tích điện hóa được thực hiện trên thiết bị tích hợp.

Ảnh điện di cho thấy cấu trúc đặc trưng của sản phẩm LAMP và cho phép đối chiếu trực tiếp với kết quả phát hiện điện hóa trên biochip.

Hình thái dải/vệt DNA và nguyên lý LAMP

Ở làn 4 là thang DNA 100 bp, xuất hiện nhiều dải/vệt DNA (band) mảnh, cách đều nhau từ vùng thấp đến cao, dùng để ước lượng kích thước các sản phẩm LAMP.

Làn 1 (mẫu huyết tương bệnh nhân HBV dương tính) xuất hiện một dải sáng lớn là “vệt DNA nhiều bậc” trải dài từ vùng vài trăm bp tới vài kbp, kèm nhiều band DNA con; đây chính là kiểu “ladder” đặc trưng của LAMP do sản phẩm là các cấu trúc DNA lặp lại, kéo dài liên tục với nhiều kích thước khác nhau.

So sánh giữa mẫu dương, âm và mẫu chứng

Làn 2 (huyết tương bệnh nhân âm tính HBV) không xuất hiện band DNA sáng rõ ràng, chỉ thấy nền mờ giống như background, chứng tỏ không có sản phẩm LAMP đặc hiệu được tạo ra từ mẫu này.

Làn 3 (mẫu âm từ bộ kit LAMP của Eiken – không chứa DNA khuôn) cũng không có band DNA đặc hiệu, cho thấy hệ phản ứng không bị nhiễm chéo hay tự khuếch đại; đây là đối chứng âm chuẩn để khẳng định độ đặc hiệu của phản ứng.

Như vậy, chỉ có làn 1 cho “vệt DNA nhiều bậc” đặc trưng, hoàn toàn phù hợp với việc mẫu này đã được xác nhận HBV dương tính bằng xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện; điều đó đồng nhất với kết quả điện hóa trên thiết bị tích hợp, nơi mẫu dương cho tín hiệu dòng suy giảm mạnh theo thời gian trong khi các mẫu âm gần như không đổi.



Hình 3.3. Điện di trên gel của sản phẩm LAMP sau khi kết thúc phản ứng khuếch đại.

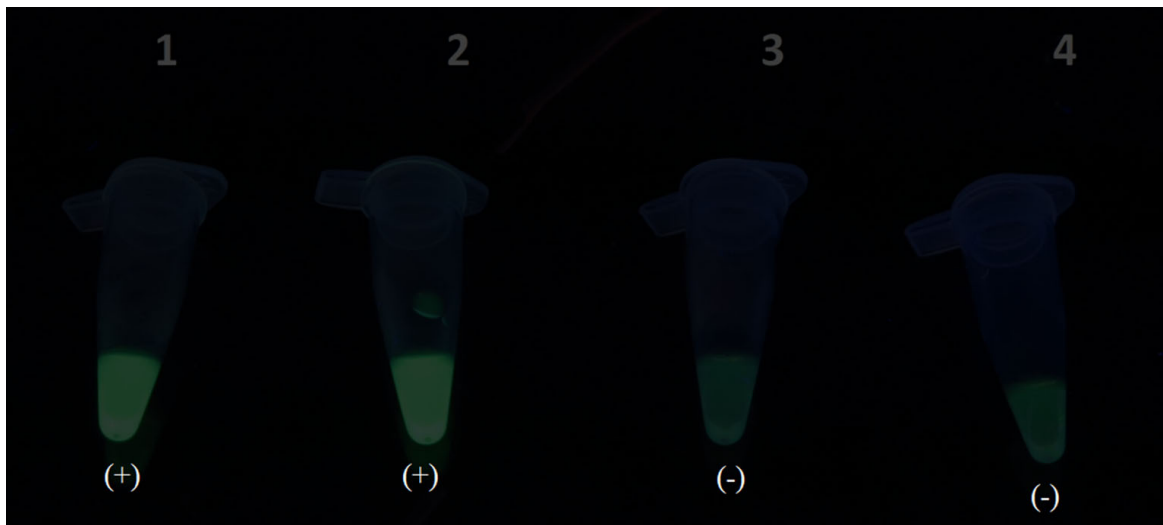
Trong đó: Làn 1 là huyết tương chiết xuất từ bệnh nhân HBV dương tính (được xác minh bằng xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện NĐTW); làn 2 là huyết tương chiết xuất từ bệnh nhân âm tính với HBV (được xác minh bằng xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện NĐTW); làn 3 là mẫu âm (trong bộ LAMP từ Eiken); làn 4 là 100-bp DNA marker (Fermentas).

Liên hệ với phát hiện điện hóa trên biochip

Trong thí nghiệm đã thực hiện, sản phẩm LAMP sinh ra từ mẫu dương tính tạo nhiều dsDNA, làm methylene blue xen cài mạnh và dòng điện hoá giảm rõ theo thời gian; mẫu âm không tạo dsDNA nên dòng MB giữ gần như không đổi.

Hình 3.3 chứng minh rằng sau khi hoàn tất phản ứng, sản phẩm trong buồng LAMP (mẫu dương) thực sự tồn tại dưới dạng “vệt DNA nhiều bậc” đặc trưng cho LAMP, tức là tín hiệu điện hóa chúng ta ghi nhận không phải nhiễu mà phản ánh đúng quá trình khuếch đại HBV.

Sự trùng khớp giữa các dải/vệt DNA LAMP đặc hiệu trên gel và tín hiệu điện hóa đặc trưng trên biochip khẳng định rằng hệ tích hợp LAMP–EC–MF có thể thay thế bước điện di truyền thống để phát hiện HBV một cách nhanh hơn, sử dụng ít mẫu hơn nhưng vẫn đảm bảo độ tin cậy tương đương.



Hình 3.4. Phát hiện huỳnh quang của sản phẩm LAMP sau khi kết thúc phản ứng khuếch đại

Trong đó: (1) huyết tương chiết xuất từ bệnh nhân HBV dương tính (xác minh bằng xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện NĐTW), (2) đối chứng dương tính với LAMP (trong bộ LAMP từ Eiken), (3) huyết tương chiết xuất từ Bệnh nhân âm tính với HBV (xác minh bằng xét nghiệm miễn dịch tại bệnh viện NĐTW), (4) mẫu âm (trong bộ LAMP của Eiken).

3.1.4. Kết luận

Là một bước tiến tới sự phát triển của phương pháp phát hiện mầm bệnh tại chỗ nhanh chóng và chính xác, NCS đã giới thiệu thiết bị tích hợp LAMP – EC – MF có thể phát hiện mầm bệnh với lượng mẫu rất nhỏ nhưng cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao bằng một quy trình đơn giản.

Toàn bộ quá trình chẩn đoán bằng cách sử dụng biochip được mô tả được thực hiện trong vòng chưa đầy 70 phút (nhanh hơn gấp đôi hoặc gấp ba lần so với PCR truyền thống). Quan trọng hơn, kỹ thuật này được áp dụng nhiều hơn so với PCR thời gian thực điển hình và các kỹ thuật quang học phức tạp để phát triển các xét nghiệm

chẩn đoán tại chỗ để chống lại các dịch bệnh hoặc bệnh di truyền khác nhau, đặc biệt là ở một số quốc gia hạn chế về tài nguyên.

Thiết kế đơn giản, nhiệt độ phản ứng thấp và phân tích định lượng mẫu trong thời gian ngắn cuối cùng sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng chip này như một thiết bị cầm tay gọn nhẹ, không chỉ để tầm soát nhanh HBV hoặc các mầm bệnh khác, mà còn cho chẩn đoán lâm sàng và các ứng dụng khoa học đời sống khác.

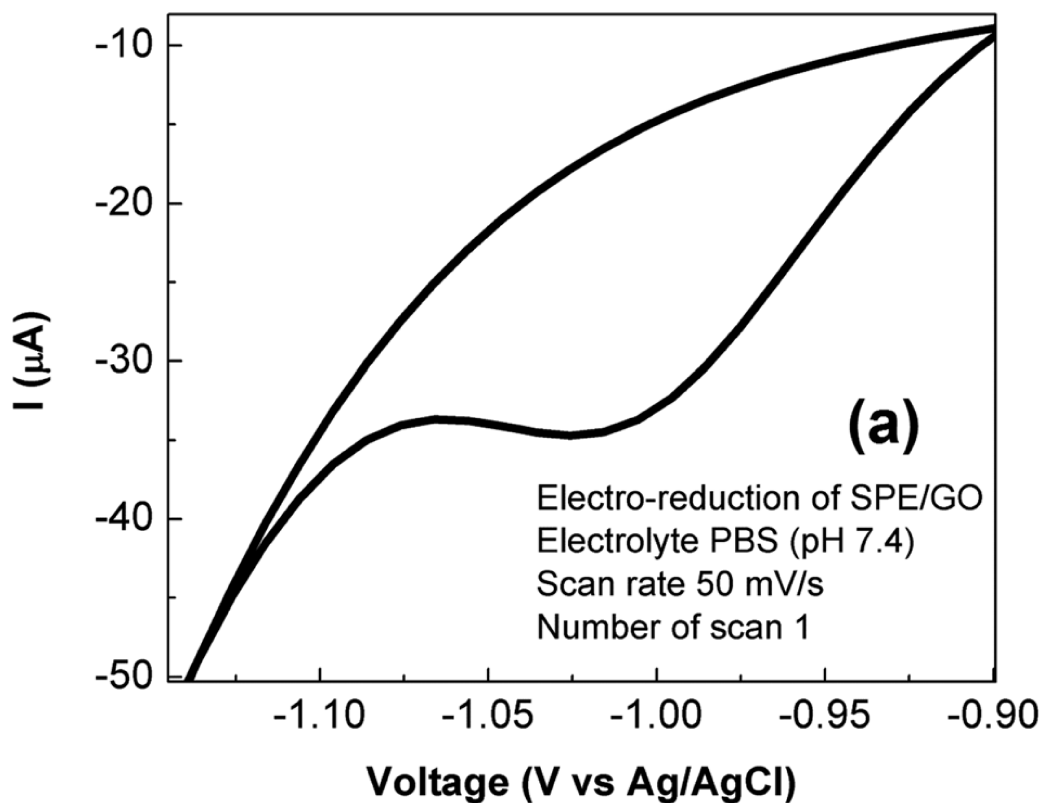
3.2. Nghiên cứu chế tạo cảm biến điện hóa rGO-PANi để phát hiện sản phẩm khuếch đại DNA bằng phương pháp đo thế mạch hở

3.2.1. Kết quả và thảo luận

3.2.1.1. Chuẩn bị màng rGO-PANi

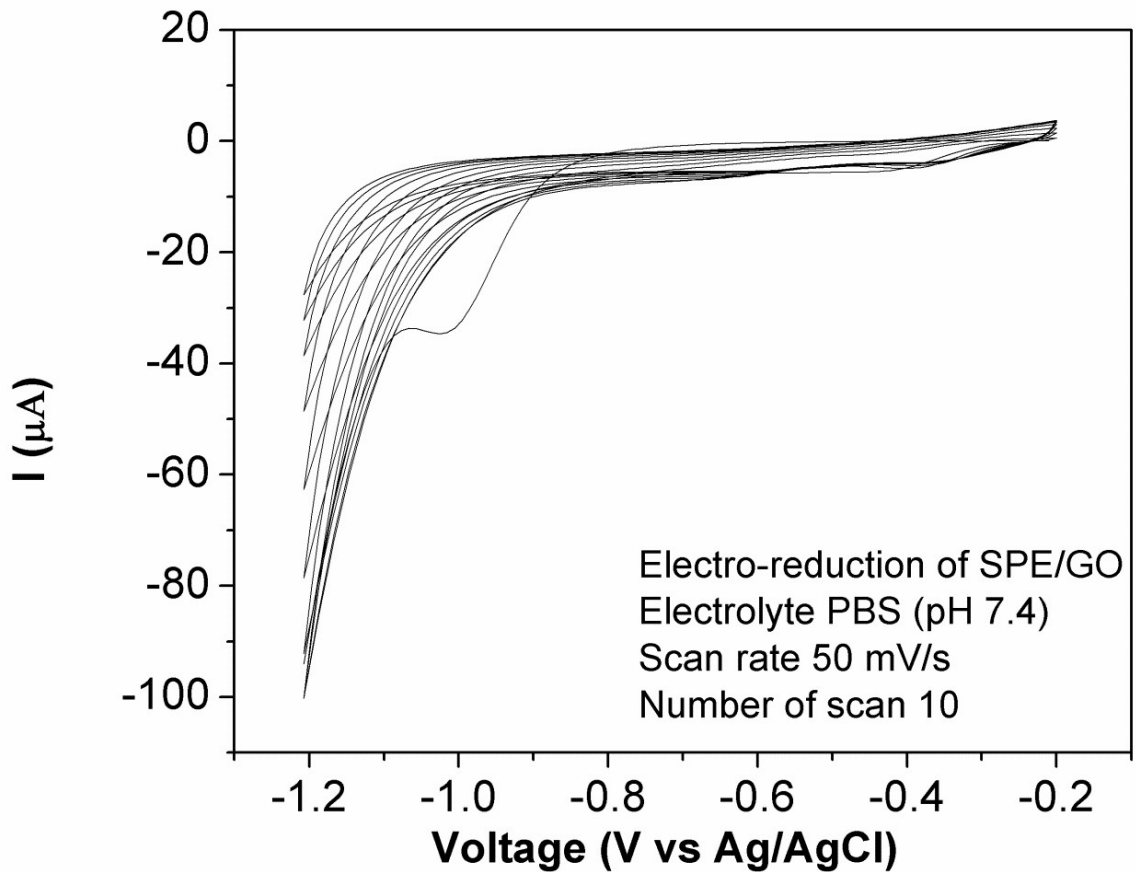
Phương pháp mạ điện cung cấp một quy trình hiệu quả và linh hoạt để tổng hợp các polyme có cấu trúc nano và các vật liệu composit của chúng. Trong nghiên cứu này, màng rGO-PANi được chế tạo bằng cách điện phân anilin 0,3 M trong dung dịch H_2SO_4 0,5 M trên bề mặt điện cực SPE đã được biến tính bằng rGO.

Hình 3.5 cho thấy quá trình khử lớp graphene oxit được nhỏ phủ trên điện cực: trong chu kỳ quét thế tuần hoàn đầu tiên xuất hiện một đỉnh khử mạnh tại khoảng -1000 mV, với thế khởi đầu (onset) khoảng -900 mV.



Hình 3.5. Khử điện của SPE phủ graphene oxit.

Ở các chu kỳ tiếp theo, cường độ đỉnh khử giảm nhanh (Hình 3.6) và không quan sát được đỉnh anốt, chứng tỏ quá trình khử graphene oxit thành dạng rGO diễn ra gần như không thuận nghịch.



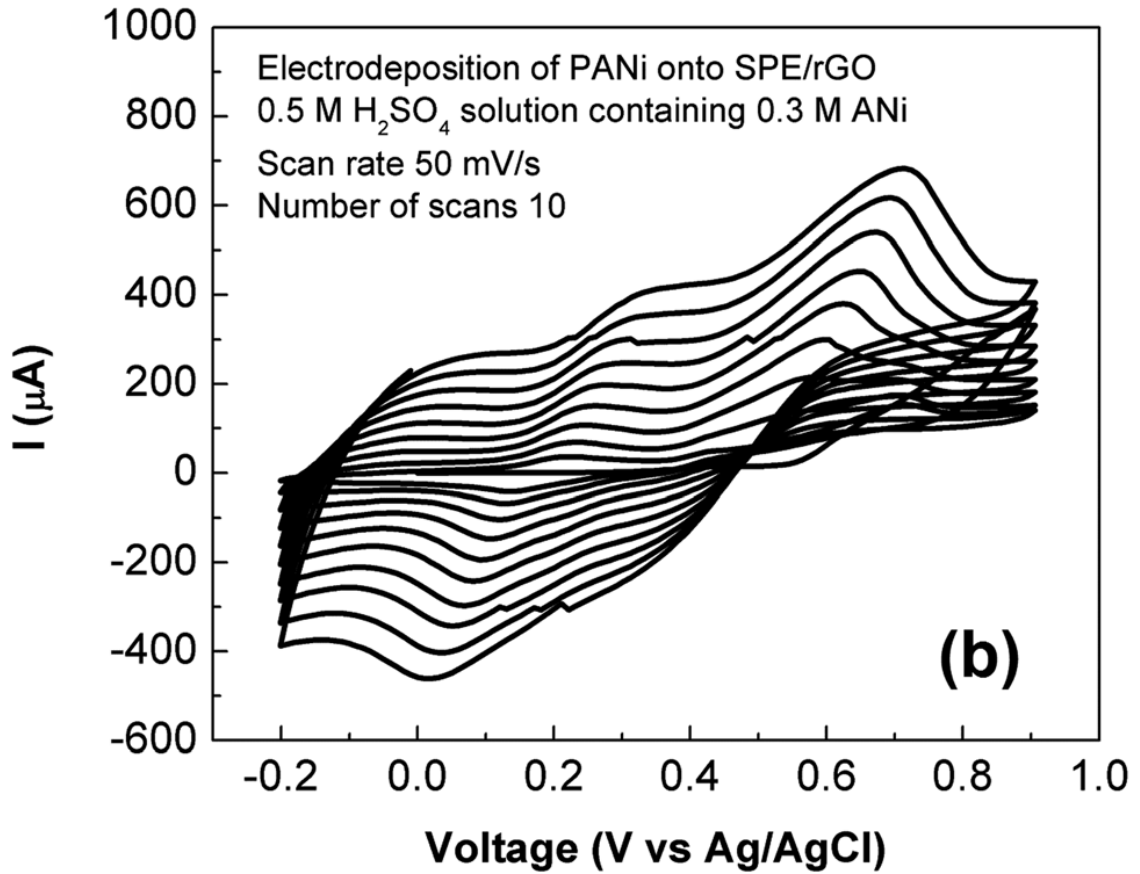
Hình 3.6. Màng graphene oxit được khử điện hóa bằng cách quét trong dung dịch PBS (pH 7,4) ở tốc độ quét 50 mV / s trong nhiều lần quét.

Các đường cong quét thể tuần hoàn thu được trong quá trình mạ PANi trên nền rGO được trình bày trong Hình 3.7.

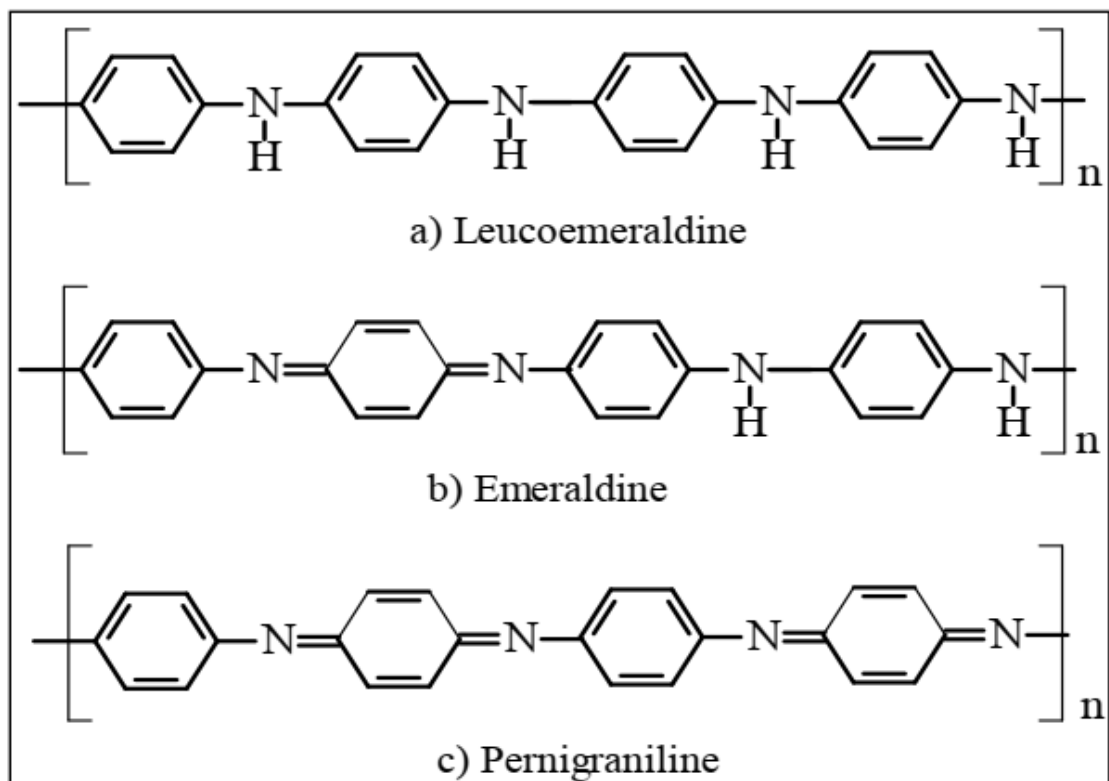
Sự tăng dần mật độ dòng cho thấy lớp PANi hình thành và phát triển trên bề mặt rGO, đồng thời phản ánh sự chuyển đổi giữa các trạng thái oxi hóa khác nhau của polyanilin.

Cụ thể, sóng anốt thứ nhất tại +225 mV (so với Ag/AgCl) đặc trưng cho quá trình chuyển từ dạng leucoemeraldine sang muối emeraldine, trong khi sóng anốt thứ hai tại +565 mV (so với Ag/AgCl) tương ứng với sự hình thành muối pernigraniline pha tạp hoàn toàn.

Quá trình quét được dừng ở 0 V nhằm thu được polyanilin ở dạng emeraldine, là dạng dẫn điện duy nhất của polymer này.



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



Hình 3.8. Các trạng thái có sẵn của polyaniline.

Trong đó: *Leucoemeraldine* (trong suốt, dẫn điện kém), *Emeraldine* (xanh lá cây, dẫn điện) và *Pernigraniline* (xanh lam đậm, dẫn điện kém). Bazo emeraldine có thể chuyển hóa thuận nghịch thành muối emeraldine (quá trình pha tạp H^+ hoặc proton hóa).

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

Ảnh SEM cho thấy sự khác biệt rất rõ giữa màng rGO thuần và màng composite rGO-PANi.

Màng rGO (hình 3.9a)

Khi nhìn ảnh SEM, màng rGO gần như là những tấm lớn dẹt nằm phủ kín, không thấy rõ kênh rỗng hay lỗ xốp mở ra bề mặt. Cấu trúc này cho thấy các tấm rGO có xu hướng kết tụ, dễ bị “restacking”, dẫn đến diện tích bề mặt hữu hiệu và số tâm hoạt động lộ ra không nhiều.

Trong dung dịch, các tấm rGO có xu hướng hút nhau bằng lực Van der Waals, nên sau khi sấy hoặc điện kết tủa, chúng chập lại thành “bó” nhiều lớp (restacking). Điều này làm cho khoảng cách giữa các lớp nhỏ, dung dịch khó thâm nhập sâu vào bên trong. Hệ quả với diện tích bề mặt và tâm hoạt động là khi các tấm dán sát và phẳng, phần lớn diện tích bề mặt của rGO nằm ở giữa các lớp, bị “che khuất”; chỉ phần ngoài cùng tiếp xúc với dung dịch, nên diện tích bề mặt hữu hiệu tham gia hấp phụ/trao đổi điện tích giảm.

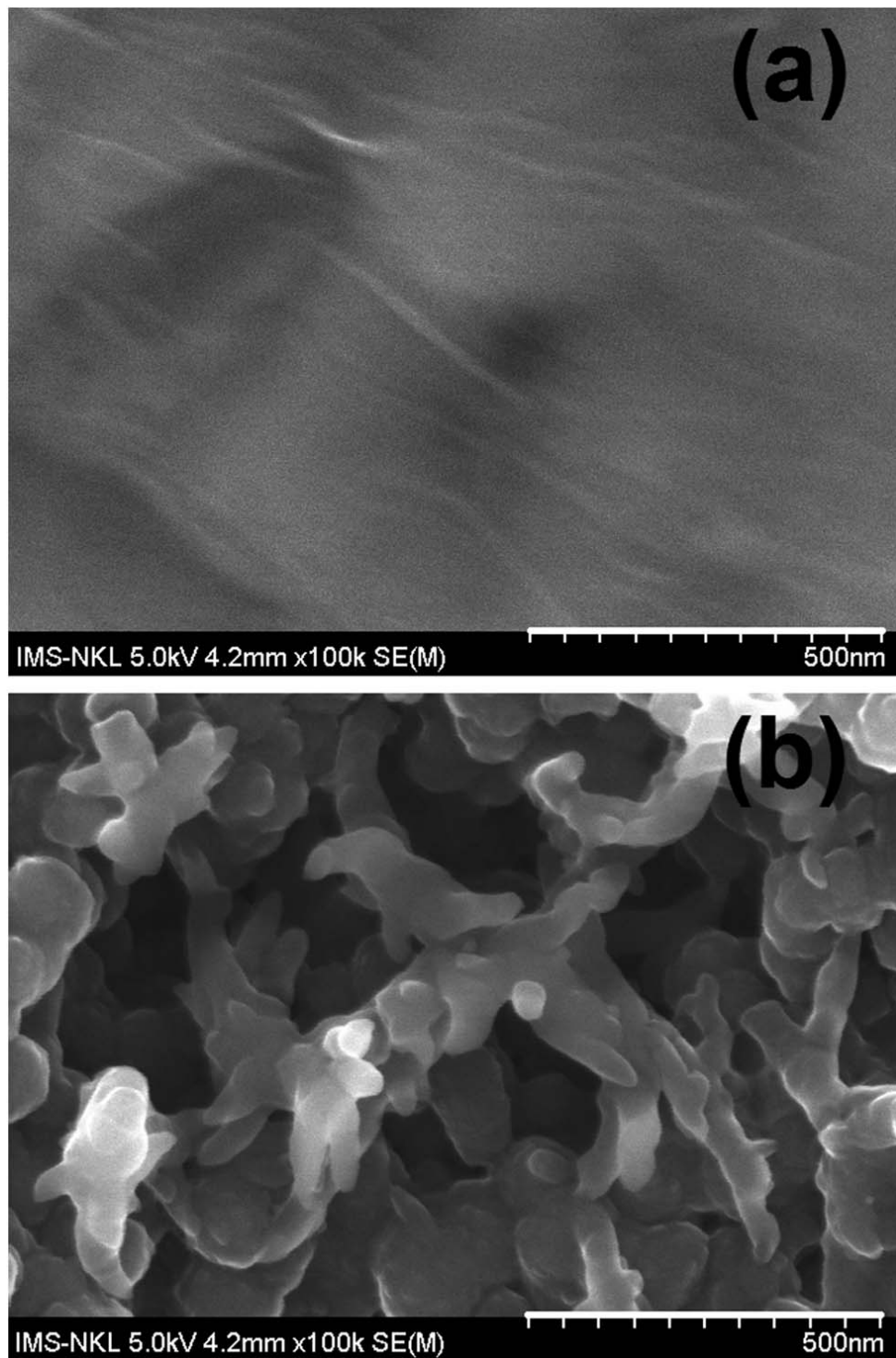
Các tâm hoạt động (khuyết tật, mép tấm, nhóm chức, lỗ xốp...) thường nằm ở cạnh và bề mặt lộ ra. Nếu cấu trúc quá phẳng, ít khe rãnh, các vị trí này bị chôn bên trong khối xếp chồng, nên số tâm hoạt động hữu ích cho phản ứng điện hóa hoặc hấp phụ cũng ít hơn so với vật liệu có cấu trúc xốp, gồ ghề.

Trên ảnh SEM (hình 3.9b), bề mặt không còn phẳng mà xuất hiện rất nhiều cấu trúc dạng “hạt”, “cột” hoặc “dải” nhô lên, phân bố dày đặc trên nền rGO. Các cấu trúc này là polyanilin được lắng đọng/điện phân bám chặt vào các tấm rGO.

Giữa các hạt và dải PANi có nhiều khoảng trống, khe kẽ và lỗ rỗng nối thông với nhau, nên toàn bộ màng trở thành một mạng xốp ba chiều: dung dịch điện ly có thể len lỏi từ trên bề mặt xuống sâu vào bên trong màng, chứ không chỉ trượt trên một mặt phẳng như với rGO thuần.

Do có nhiều gờ, hạt và lỗ rỗng, diện tích bề mặt “thực” của màng (tính theo tổng diện tích tất cả các mặt tiếp xúc với dung dịch) lớn hơn rất nhiều so với diện tích hình học. Nói cách khác, cùng một diện tích điện cực nhưng màng rGO-PANi cung

cấp nhiều chỗ tiếp xúc cho ion/phân tử hơn. Trong mạng xốp này tồn tại hai loại tâm hoạt động: (i) tâm trên khung rGO (khuyết tật, mép tấm, lỗ xốp, vùng sp^2/sp^3 chuyển tiếp) và (ii) tâm trên PANi (nhóm $-NH-$, $-NH^+$, vòng benzoid/quinoid có thể nhận $-$ cho điện tử, proton hóa/khử proton). Các tâm này phân bố dày đặc trên khắp bề mặt gồ ghề và bên trong các kênh rỗng, nên số vị trí có thể xảy ra hấp phụ ion, trao đổi điện tích hay phản ứng oxy-hóa/khử tăng mạnh.



Hình 3.9. Hình ảnh SEM của màng rGO (a) và rGO-PANi (b).

Hệ quả đối với tính điện hóa

Kênh rỗng mở và diện tích bề mặt lớn giúp ion trong dung dịch di chuyển nhanh tới mọi góc ngách của màng, giảm trở kháng khuếch tán và giúp dòng điện phản ứng đạt giá trị cao hơn trong cùng thời gian.

Số lượng tâm hoạt động nhiều, lại được phân bố trong toàn bộ thể tích màng, làm tăng dung lượng tích trữ điện tích (dung lượng điện hóa/pseudocapacitance) và độ nhạy nếu dùng làm cảm biến, vì chỉ một thay đổi nhỏ nồng độ ion cũng có thể tương tác với rất nhiều vị trí trên màng composite

Hình 3.10 là phổ ATR-FTIR so sánh hai mẫu: SPE/rGO (đường đen) và SPE/rGO/PANi (đường đỏ).

Đặc điểm phổ của SPE/rGO

- Đường đen gần như phẳng, không có đỉnh hấp thụ rõ, cho thấy màng rGO sau khử có rất ít nhóm chức hữu cơ còn lại (ít liên kết C=O, C-O, C-N...).

- Điều này phù hợp với rGO có mức độ khử cao, mạng sp^2 (C=C) chiếm ưu thế nên phổ truyền qua chỉ dao động nhẹ quanh 99–100%.

Đặc điểm phổ của SPE/rGO/PANi:

- Đường đỏ xuất hiện nhiều đỉnh hấp thụ rõ rệt, chứng tỏ đã gắn thêm các nhóm chức đặc trưng của polyanilin trên nền rGO.

- Cường độ truyền qua giảm xuống khoảng 94–98%, phản ánh sự hấp thụ hồng ngoại mạnh hơn do các liên kết mới trong PANi.

Các đỉnh chính

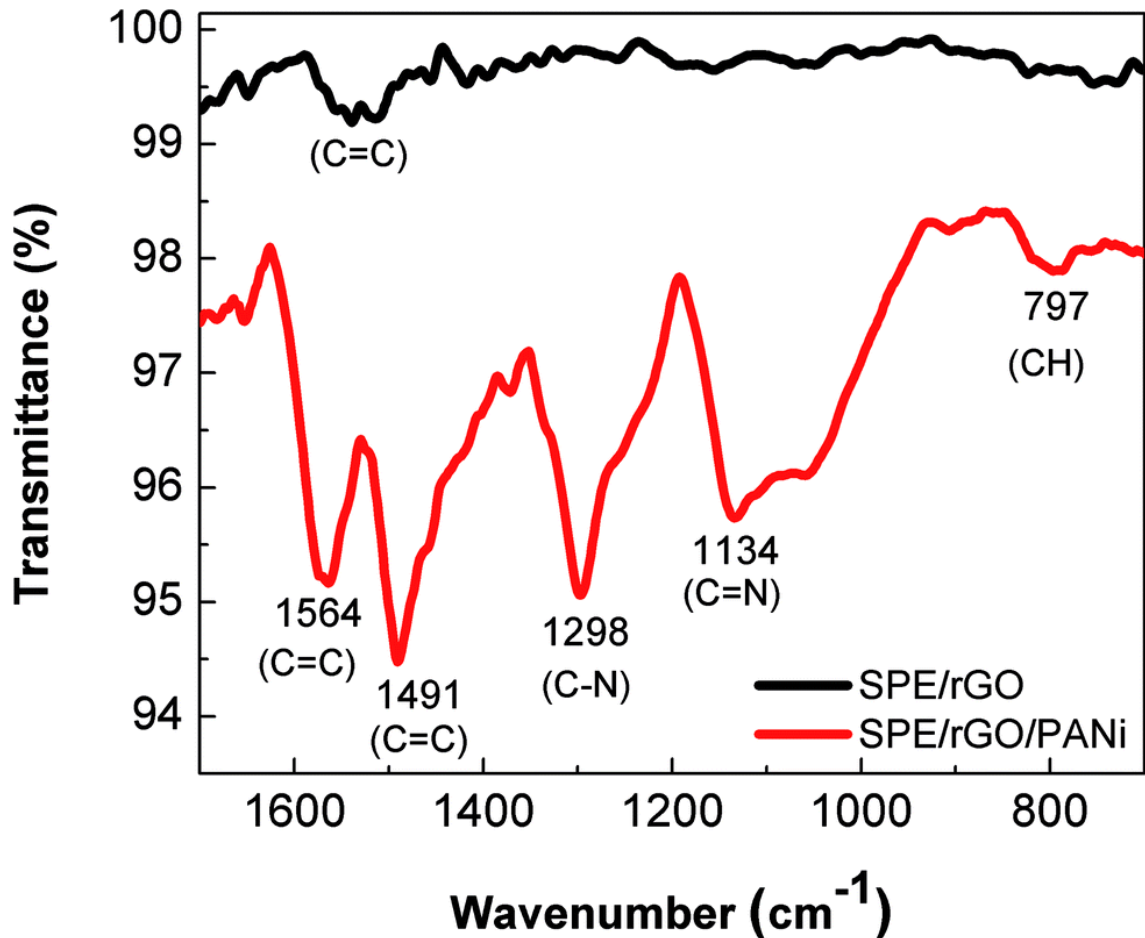
- 1564 và 1491 cm^{-1} : dao động kéo giãn C=C trong vòng benzen/quinonoid của chuỗi PANi.

- 1298 cm^{-1} : dao động kéo giãn C-N của cấu trúc benzenamin trong PANi.

- 1134 cm^{-1} : dao động C=N, liên quan đến cấu trúc quinonoid hoặc trạng thái proton hóa của PANi.

- 797 cm^{-1} : dao động uốn ngoài mặt phẳng của liên kết C-H trên vòng thơm.

Sự khác biệt rõ ràng giữa phổ đen (rGO) và đỏ (rGO/PANi) chứng minh PANi đã được phủ/thấm lên bề mặt rGO. Sự xuất hiện đồng thời các đỉnh C=C, C-N, C=N đặc trưng của PANi cho thấy cấu trúc polyanilin được hình thành tốt, giúp màng composite có thêm tính dẫn điện và các tâm chức để tương tác với ion/phân tử trong cảm biến.



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

Hai phổ Raman ở Hình 3.11 và 3.12 chứng minh quá trình khử GO → rGO và tạo composite rGO-PANi, đồng thời cho thấy cấu trúc và mức độ khuyết tật của vật liệu.

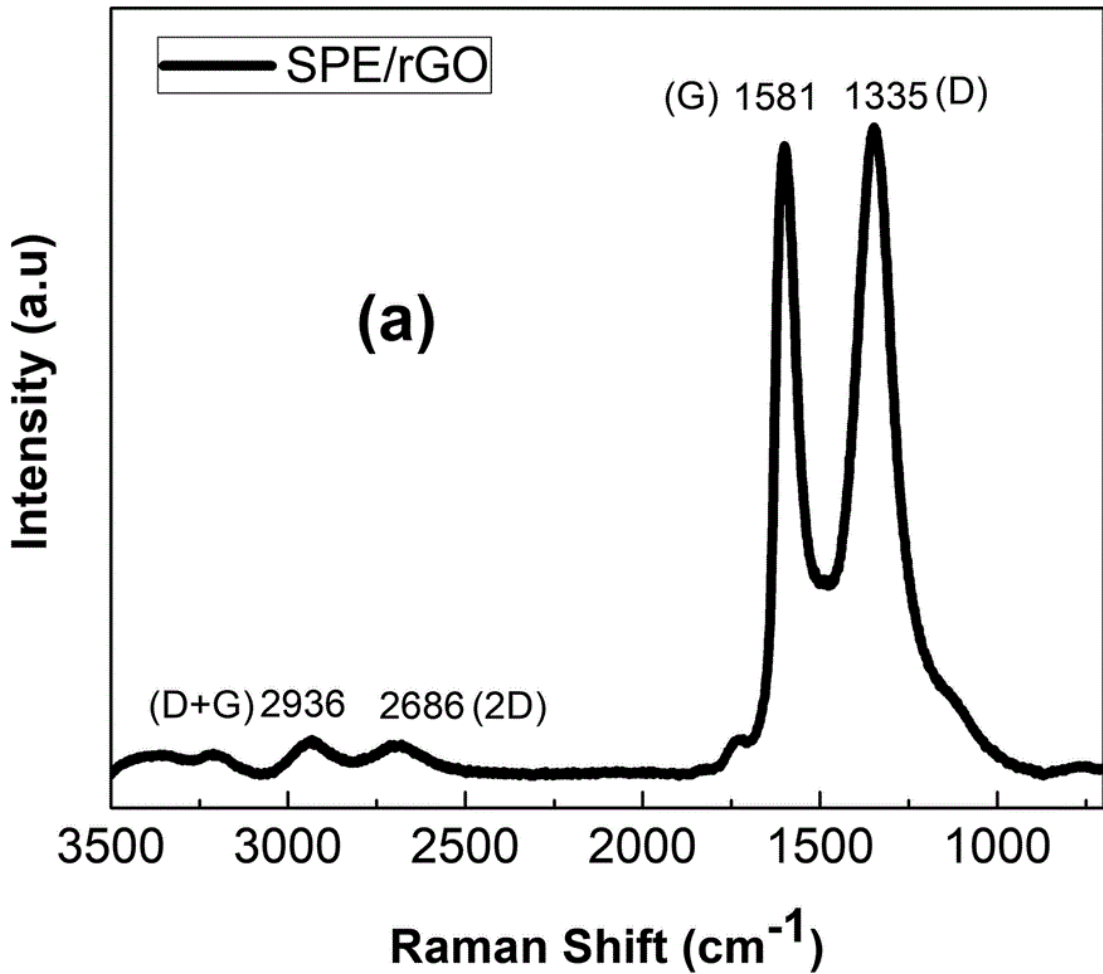
Phổ Raman của rGO (Hình 3.11)

- Các đỉnh chính xuất hiện tại 1335 cm⁻¹ (dải D) và 1581 cm⁻¹ (dải G), cùng đỉnh bậc hai 2D tại 2686 cm⁻¹ và vai nhỏ (D+G) khoảng 2936 cm⁻¹, là đặc trưng của hệ carbon sp² giống graphit.

- Dải D liên quan tới tán xạ bởi khuyết tật, biên hạt, các vùng sp³ hoặc rối loạn mạng; dải G là tán xạ bậc nhất của mode E^{2g} của mạng carbon sp² có trật tự.

Tỷ lệ I_D/I_G và mức khử của rGO: Tỷ lệ cường độ I_D/I_G ≈ 0,946 cao hơn của GO (0,803), cho thấy số tâm khuyết tật tương đối tăng lên sau khử điện hóa.

I_G phản ánh số lượng và mức độ trật tự của các miền sp²: miền càng lớn, mạng lưới lục giác càng hoàn chỉnh thì đỉnh G càng mạnh. I_D chỉ xuất hiện khi có khuyết tật/biên hạt/vùng sp³; càng nhiều rối loạn thì cường độ D càng tăng. Vì vậy, I_D/I_G càng lớn thì “tỷ lệ khuyết tật trên miền trật tự” càng cao.

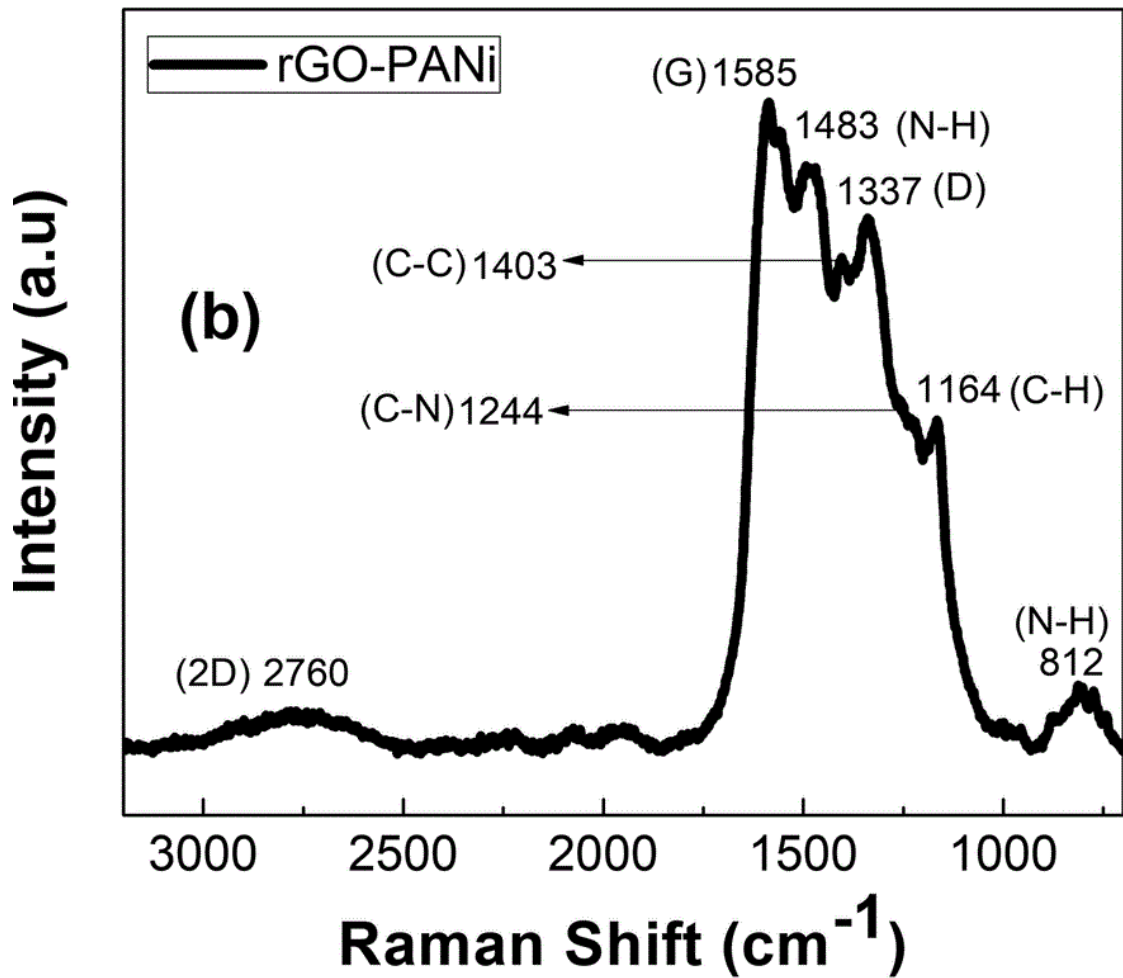


Hình 3.11. Phổ Raman của màng rGO

GO ban đầu có nhiều nhóm chức oxy (C–O, C=O, COOH) chen trong mạng, khiến các miền sp^2 bị chia cắt nhưng vẫn còn khá “to” và phân bố tương đối đều. Khi khử, nhiều nhóm oxy bị loại bỏ, một phần mạng sp^2 được phục hồi, nhưng quá trình này không trở lại dạng graphit hoàn hảo. Thay vào đó, những tấm sp^2 lớn bị “băm nhỏ” thành nhiều miền sp^2 nhỏ, ngăn cách bởi lỗ trống, mép, khuyết tật và một phần vùng sp^3 . Số biên hạt và khuyết tật trên một đơn vị diện tích tăng, nên tỉ lệ hiệu D (nhạy với biên và khuyết tật) tăng mạnh hơn so với G, dẫn tới I_D/I_G từ 0,803 (GO) lên 0,946 (rGO).

Mức khử càng cao thì lượng oxy giảm, độ dẫn điện tăng, nhưng đồng thời tạo nhiều “vết nứt” nhỏ trong mạng, nên phổ Raman thường thấy I_D/I_G tăng hoặc đạt cực đại rồi giảm tùy điều kiện.

Trong trường hợp này, I_D/I_G tăng chứng tỏ quá trình khử đã diễn ra hiệu quả (oxy giảm), song cấu trúc thu được là rGO với nhiều miền sp^2 nhỏ giàu khuyết tật, khác với graphit tinh thể hoàn hảo; điều này lại có lợi cho hoạt tính điện hóa vì tạo nhiều tâm hoạt động và diện tích bề mặt lớn.



Hình 3.12. Phổ Raman của màng rGO-PANi

Phổ Raman của rGO-PANi (Hình 3.12)

Đỉnh G dịch nhẹ từ 1581 lên 1585 cm^{-1} , đỉnh D từ 1335 lên 1337 cm^{-1} , còn 2D dịch từ 2686 lên 2760 cm^{-1} , chứng tỏ có tương tác mạnh (như chuyển điện tích, ứng suất hoặc pha tạp) giữa mạng graphene và chuỗi PANi.

Sự dịch chuyển về số sóng cao thường gắn với hiệu ứng doping p hoặc n làm thay đổi hằng số lực của liên kết C=C trong mạng sp^2 ; đồng thời cho thấy PANi bám phủ lên rGO chứ không chỉ trộn cơ học.

Các đỉnh Raman đặc trưng của PANi trên rGO

- Đỉnh 812 cm^{-1} được gán cho dao động biến dạng ngoài mặt phẳng của nhóm N-H hoặc C-H trong vòng benzenoid (amine deformation, benzenoid), phản ánh đơn vị benzenoid trong PANi.

- Đỉnh 1164 cm^{-1} là dao động biến dạng trong mặt phẳng của C-H ở vòng benzenoid, thường được coi là dấu hiệu của trạng thái emeraldine muối dẫn điện.

- Đỉnh 1244 cm^{-1} tương ứng với dao động kéo giãn C-N^+ trong đơn vị quinoid, liên quan trực tiếp tới mức độ proton hóa/doping của PANi.

- Đỉnh 1403 cm^{-1} gán cho dao động kéo giãn C-C hoặc C=C trong vòng quinoid, cho thấy sự tồn tại của các đoạn quinoid xen kẽ benzoid trong chuỗi.

- Đỉnh 1483 cm^{-1} là dao động uốn N-H trong cấu trúc quinoid, cũng liên hệ với trạng thái proton hóa và khả năng dẫn điện của polymer.

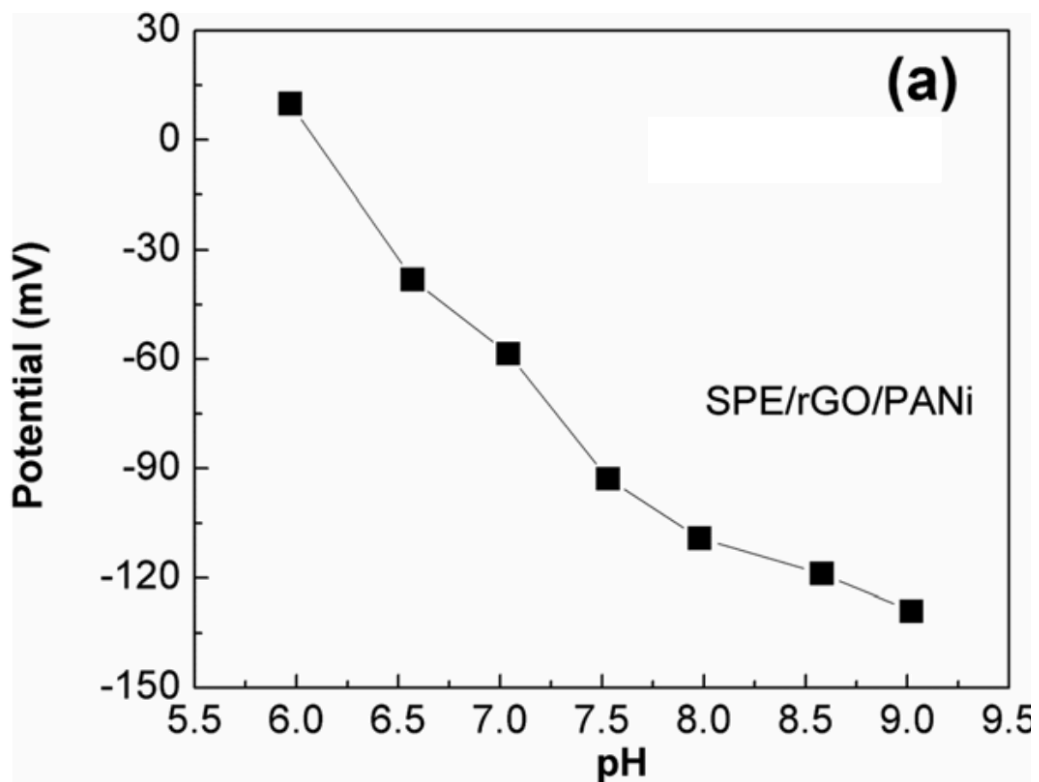
Ý nghĩa tổng quát của hai phổ

So sánh Hình 3.11 và 3.12 cho thấy: (i) mạng rGO sau khử có mức khuyết tật tăng nhưng vẫn giữ được các dải D, G, 2D điển hình; (ii) khi phủ PANi, vị trí và dạng các dải D, G, 2D đều biến đổi, đồng thời xuất hiện thêm nhiều đỉnh PANi, chứng minh sự hình thành lớp polymer dẫn điện gắn với rGO.

Sự hiện diện đồng thời các dải benzoid–quinoid của PANi cùng với dải D, G, 2D của graphene cho thấy composite rGO-PANi đạt trạng thái emeraldine muối, có mật độ tâm dẫn điện cao, phù hợp cho ứng dụng điện hóa như cảm biến.

3.2.1.3. Kiểm tra độ pH

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) như được mô tả trong Hình 3.13 (a).

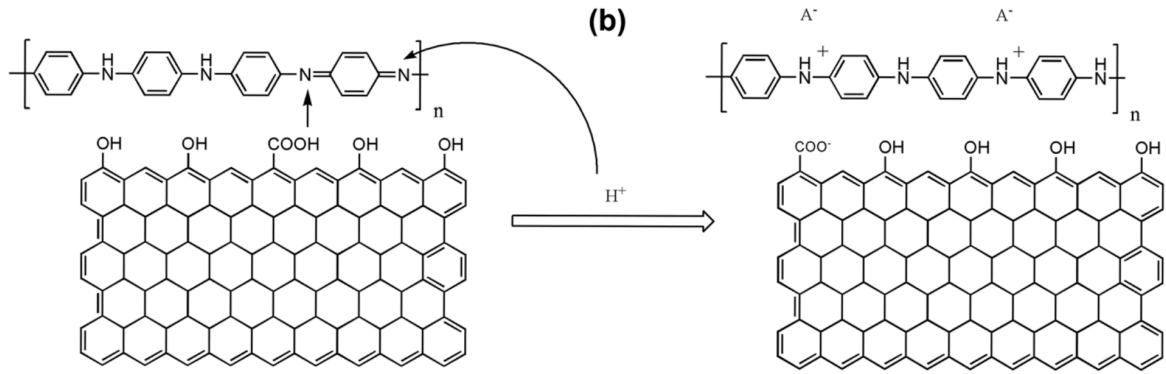


Hình 3.13a. Đường chuẩn pH của điện cực SPE / rGO-PANi.

Ta thấy rằng giá trị OCP giảm khi độ pH tăng lên. Hai vùng tuyến tính thu được ở pH dao động từ 6.0 đến 7.5 và pH dao động từ 7.5 đến 9.0 với các phương trình hồi quy sau:

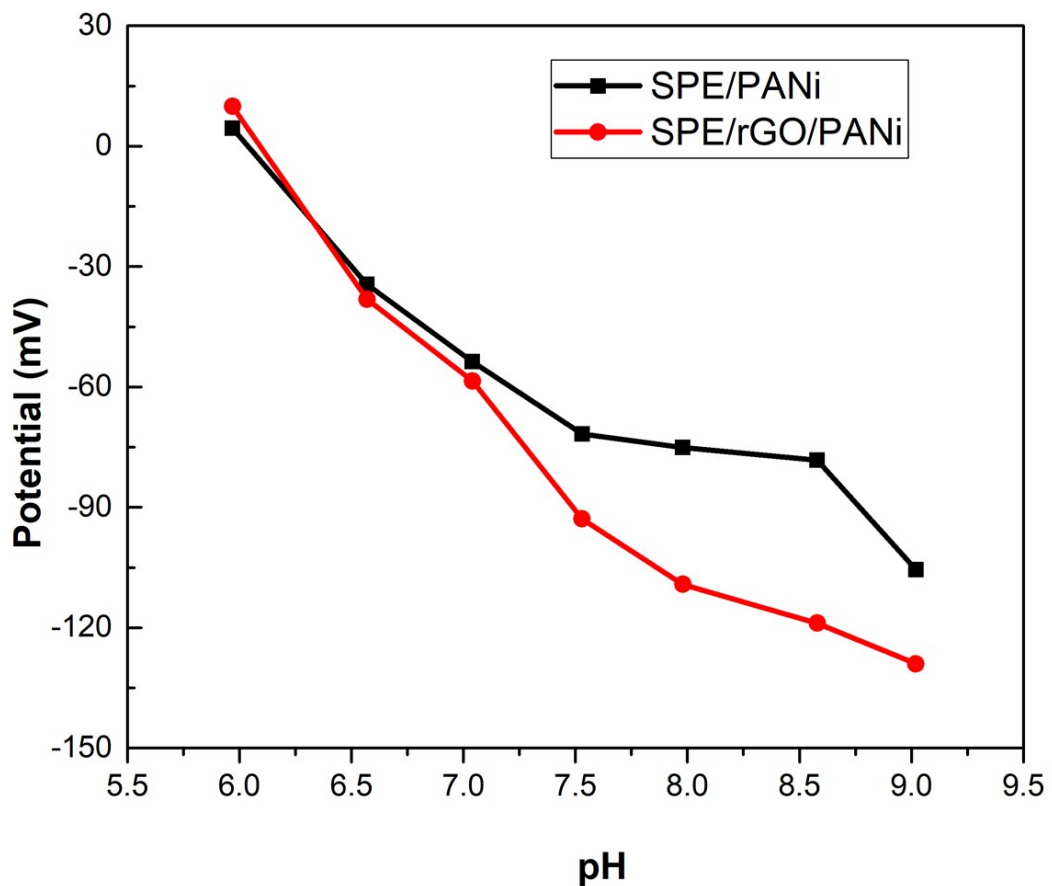
$$\text{OCP} = 389,8803 - 64,1524 \times \text{pH} \quad (R^2 = 0,9831, \text{pH}: 6,0 - 7,5)$$

$$\text{OCP} = 78,8339 - 23,149 \times \text{pH} \quad (R^2 = 0,9598, \text{pH}: 7,5 - 9,0)$$



Hình 3.13b. Sơ đồ thể hiện cơ chế nhạy với pH của điện cực SPE / rGO-PANi.

Điện thế cân bằng tăng khi pH giảm do sự proton hóa dạng cơ sở emeraldine của polyaniline. Khoảng pH 6,0–9,0 (dung dịch PBS đệm).



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

Biểu đồ thể hiện mối quan hệ giữa điện thế (mV) và pH cho hai điện cực: SPE/PANi (đường đen, hình vuông) và SPE/rGO/PANi (đường đỏ, hình tròn) trong khoảng pH ~5,8–9,0. Điện thế giảm gần tuyến tính khi pH tăng, nhưng hai vật liệu có độ dốc và vùng làm việc hơi khác nhau.

Trục hoành độ pH, từ khoảng 5,5 đến 9,5, biểu diễn môi trường từ hơi axit đến trung tính–kiềm nhẹ. Trục tung là điện thế (mV), từ khoảng +20 mV đến –150 mV, cho thấy đây là đường chuẩn pH điện cực chỉ thị chịu ảnh hưởng mạnh của nồng độ H^+ .

Xu hướng đường SPE/PANi (đen):

Ở pH thấp (~6), điện thế khoảng +5–10 mV, sau đó giảm dần xuống khoảng –70 mV ở pH ~7,5 và tiếp tục giảm tới gần –100 mV ở pH ~9.

Độ dốc trung bình ước lượng cỡ vài chục mV trên mỗi đơn vị pH và tương đối gần tuyến tính giữa pH ~6,5–8,5, cho thấy điện cực hoạt động gần đáp ứng Nernst trong vùng này.

Xu hướng đường SPE/rGO/PANi (đỏ):

Ở pH ~6, điện thế ban đầu hơi cao hơn đường đen (khoảng +10–15 mV), sau đó giảm nhanh hơn, tới khoảng –90 mV ở pH ~7,5. Ở pH cao hơn (8–9), đường đỏ cho điện thế thấp hơn đáng kể (khoảng –110 đến –135 mV), chứng tỏ khi ghép rGO với PANi thì độ nhạy theo pH tăng lên (độ dốc âm lớn hơn).

Từ pH ~6–7, hai đường khá gần nhau, nghĩa là trong môi trường hơi axit đến trung tính, việc thêm rGO không làm thay đổi mạnh điện thế nhưng bắt đầu làm tăng độ dốc. Trong vùng pH cao hơn (~7,5–9), SPE/rGO/PANi cho điện thế âm hơn và biến thiên mạnh hơn so với SPE/PANi, cho thấy rGO cải thiện khả năng trao đổi proton/điện tích và làm cảm biến nhạy pH hơn, đặc biệt ở vùng kiềm nhẹ.

Đường chuẩn này dùng để suy ra pH từ điện thế đo được: mỗi giá trị pH tương ứng một điện thế xác định trên từng loại điện cực. Việc so sánh cho thấy SPE/rGO/PANi phù hợp làm đầu dò pH có độ nhạy cao hơn (đáp ứng lớn hơn với cùng thay đổi pH), trong khi SPE/PANi có đáp ứng “mềm” hơn, có thể hữu ích nếu cần vùng tuyến tính hẹp nhưng ổn định hơn.

Để tăng độ dốc (độ nhạy pH) của đường cong thế – pH, có thể sử dụng các dẫn xuất hoặc hệ PANi lai (PANi-copolymer, PANi-nanocomposite, PANi gắn nhóm thế) nhằm tối ưu hoá khả năng proton hoá/deproton hoá và dẫn điện của màng. Độ dốc càng gần (hoặc vượt) giá trị Nernst lý thuyết thì cảm biến càng nhạy với sự thay đổi pH của môi trường.

Polyaniline tồn tại chủ yếu ở ba trạng thái oxy-hoá: leucoemeraldine (khử hoàn toàn, không màu, dẫn điện kém), emeraldine (oxy hoá một nửa, màu xanh lục, dẫn điện tốt) và pernigraniline (oxy hoá hoàn toàn, màu tím sẫm, dẫn điện kém). Trong đó, chỉ có dạng emeraldine là trạng thái dẫn điện và có khả năng proton hoá thuận nghịch, nên là pha hoạt động điện hoá chính trong cảm biến pH. Đây cũng là lý do tại sao NCS dừng quá trình lắng đọng điện của màng polyaniline ở 0 mV.

Trong môi trường axit, emeraldine ở dạng muối (emeraldine salt) được proton hoá trên mạch polyme; khi pH tăng, PANi bị khử proton chuyển dần sang emeraldine base, kéo theo sự thay đổi mật độ mang điện trên chuỗi và làm dịch chuyển thế mạch hở (OCP). Sự chuyển hoá thuận nghịch *emeraldine salt* \leftrightarrow *emeraldine base* là cơ chế nền cho đáp ứng pH: pH tăng làm giảm mức proton hoá, giảm mật độ điện tích dương trên mạch, nên OCP dịch về phía âm; pH giảm gây proton hoá trở lại, OCP dịch về phía dương.

Trong quá trình proton hoá/deproton hoá, anion trong dung dịch điện ly đóng vai trò ion bù điện tích (counter-ion) để duy trì trung hoà điện tích của hệ; khi PANi khử proton, các anion này rời khỏi màng vào dung dịch, còn khi PANi được proton hoá, anion xâm nhập vào màng cùng với quá trình “doping”. Việc dừng lắng đọng điện PANi ở điện thế khoảng 0 mV nhằm thu được trạng thái oxy-hoá phù hợp (gần emeraldine) và hạn chế chuyển sang pernigraniline kém bền, từ đó tối ưu hoá tính dẫn và độ nhạy pH của màng.

Các quá trình protonation và deprotonation của PANi mang tính thuận nghịch, do đó có thể điều khiển chuyển đổi giữa emeraldine salt và emeraldine base bằng cách điều chỉnh pH hoặc điều khiển điện thế. Cảm biến PANi về nguyên tắc có thể tái sử dụng bằng cách “tái điều hoà” trạng thái proton hoá, ví dụ quét thế trong dung dịch axit sau khi màng đã bị khử proton trong môi trường kiềm. Tuy nhiên, quá trình hồi phục thường xuất hiện trễ (hysteresis) do giới hạn khuếch tán ion, tái sắp xếp cấu trúc và lão hoá màng, nên cần đánh giá ổn định lâu dài và số chu kỳ sử dụng thực tế. NCS đã thử chuyển đổi muối emeraldine thành emeraldine base bằng cách quét các điện cực đã sử dụng (trước đó đã được ủ trong chất điện phân kiềm) trong dung dịch axit mà không có monome. Các kết quả thử nghiệm đã chứng minh sự tái hình thành của emeraldine base nhưng có hiện tượng trễ.

3.2.1.4. Phản ứng LAMP

Việc phát hiện các sản phẩm LAMP được tiến hành trên bề mặt rGO-PANi, bằng phương pháp đo OCP. 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.

Đồ thị OCP cho thấy rõ ràng bề mặt rGO-PANi (positive sample) có đáp ứng với phản ứng LAMP, trong khi điện cực đối chứng (negative sample) gần như không thay đổi thế.

Trong phản ứng LAMP, mỗi bước kéo dài mạch DNA đều tiêu thụ dNTP và giải phóng ion H^+ , làm pH dung dịch giảm dần khi có khuếch đại DNA xảy ra. Màng rGO-PANi là vật liệu nhạy pH: các nhóm $-NH-/-NH^+$ trên PANi có thể proton hóa/khử proton tùy pH, dẫn đến thay đổi trạng thái oxy-hóa của PANi và phân bố điện tích trên bề mặt; sự thay đổi này làm dịch chuyển thế mạch hở của điện cực.

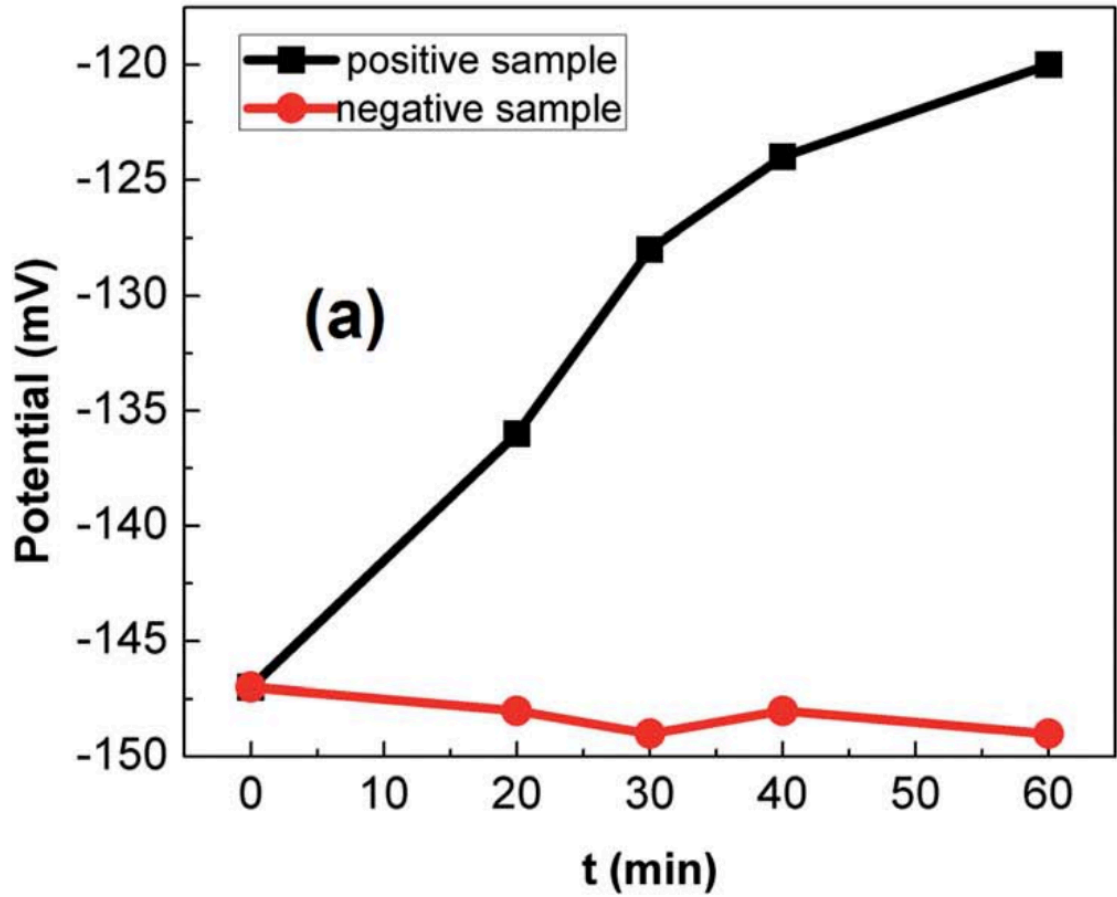
Khi phản ứng LAMP xảy ra, pH xung quanh bề mặt rGO-PANi giảm do H^+ sinh ra, làm PANi bị proton hóa mạnh hơn (tăng tỉ lệ $-NH^+$). Sự proton hóa này khiến thế cân bằng giữa PANi và dung dịch dịch chuyển về phía dương (thế ít âm hơn), nên OCP tăng dần từ khoảng -146 mV lên gần -120 mV sau 60 phút, đúng với diễn biến trên đồ thị của mẫu dương.

Với mẫu âm (không có DNA đích, hoặc không có enzyme/thuốc thử cần thiết), phản ứng LAMP không diễn ra hoặc diễn ra rất yếu, nên lượng H^+ sinh ra không đáng kể, pH dung dịch gần như không đổi. Do môi trường quanh điện cực không bị acid hóa, trạng thái proton hóa của PANi trên rGO-PANi gần như giữ nguyên, dẫn tới thế OCP dao động rất nhỏ quanh -146 đến -148 mV như đường negative sample.

Sự tách biệt rõ rệt giữa hai đường cong OCP theo thời gian (positive tăng mạnh, negative gần như phẳng) chứng minh điện cực rGO-PANi chuyển đổi được tín hiệu hóa học “giảm pH do LAMP” thành tín hiệu điện thế đo được. Nhờ đó, chỉ cần theo dõi độ dịch chuyển OCP theo thời gian trên màng rGO-PANi là có thể phân biệt mẫu có khuếch đại DNA (mẫu dương) và mẫu không khuếch đại (mẫu âm), tạo nền tảng cho một cảm biến LAMP không cần đánh dấu, đo trực tiếp bằng OCP

Hình 3.15 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 không đáng kể của OCP được tìm thấy đối với mẫu âm tính (Hình 3.15). Điều này chứng tỏ độ đặc hiệu cao của cảm biến.

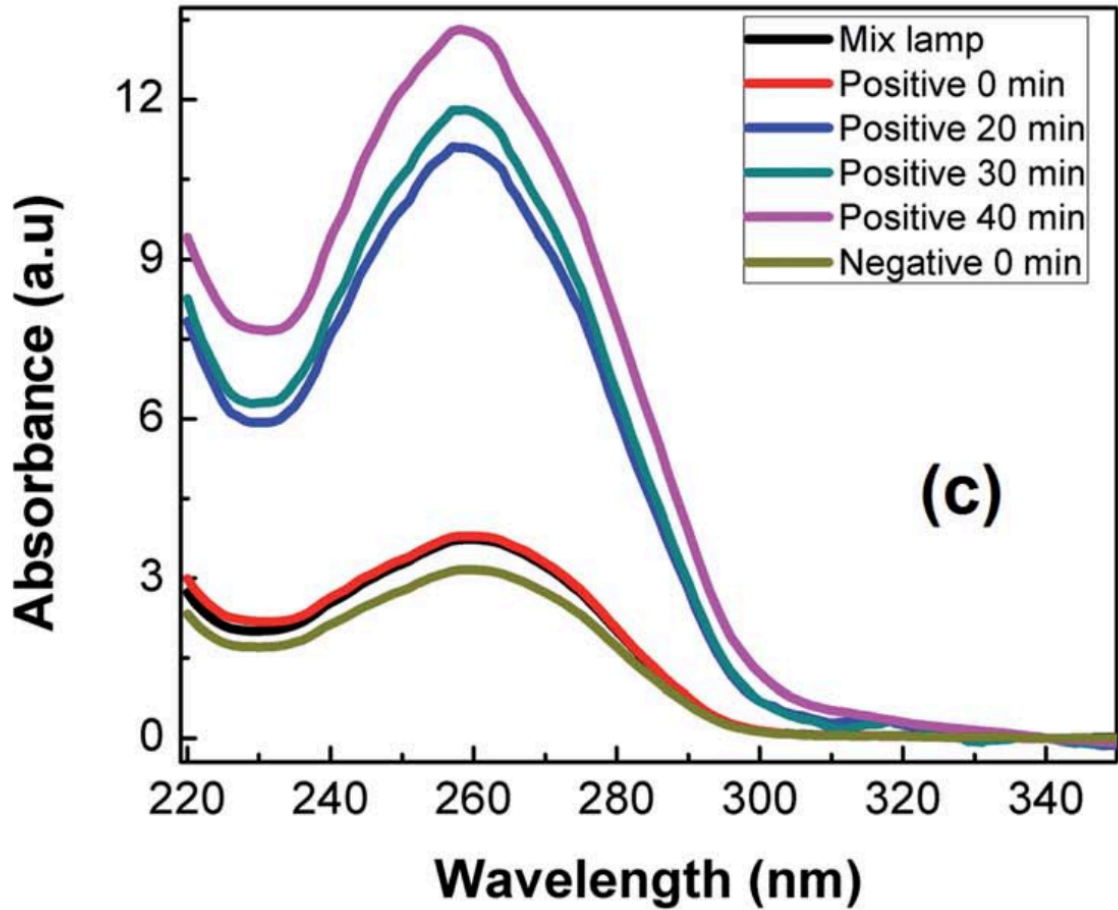
Các kết quả này phù hợp tốt với các phép đo điện di và độ hấp thụ trên gel. Trong Hình 3.16, mẫu LAMP dương tính cho thấy nhiều dải có kích thước khác nhau khi điện di trên gel agarose. Điều này là do cấu trúc lặp lại đảo ngược của các sản phẩm LAMP. Đồng thời, nồng độ DNA được tìm thấy đã tăng lên khoảng 103 lần (như được xác định từ phổ hấp thụ ở hình 3.17).



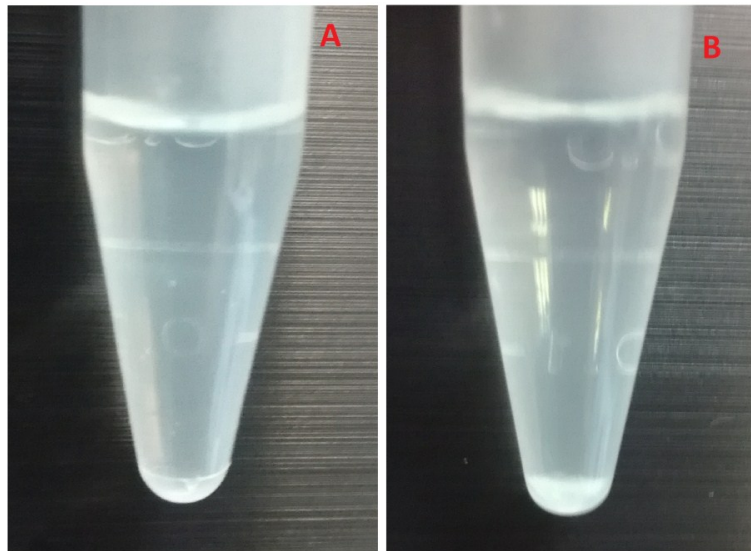
Hình 3.15. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng phương pháp điện hoá OCP



Hình 3.16. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng điện di trên gel



Hình 3.17. Kiểm tra kết quả phản ứng LAMP bằng phổ hấp thụ



Hình 3.18. Hình ảnh sản phẩm LAMP cho mẫu âm tính (bên trái) và mẫu dương tính (bên phải)

Phổ hấp thụ này cho thấy sự thay đổi đặc trưng của dung dịch LAMP dương theo thời gian, so với mẫu âm và hỗn hợp thuốc thử ban đầu. Tất cả các mẫu đều có

hai vùng hấp thụ mạnh trong miền UV: một đỉnh ở khoảng 230–240 nm và một đỉnh rộng hơn ở ~260–270 nm, đặc trưng cho các bazơ nitơ và liên kết $\pi-\pi^*$ trong DNA/nuclêôtit. Ở vùng bước sóng lớn hơn khoảng 300–340 nm, độ hấp thụ giảm mạnh về gần 0, chứng tỏ dung dịch không chứa các chromophore hấp thụ mạnh ở vùng cận tử ngoại – khả kiến.

Đường “Negative 0 min” (xanh lá) và “Positive 0 min” (đỏ) gần như trùng nhau, chứng tỏ trước khi ủ LAMP, dung dịch của hai mẫu có thành phần quang học gần giống nhau (cùng hỗn hợp enzyme, dNTP, primer, buffer; khác nhau chủ yếu ở việc có/không có DNA đích nhưng lượng rất nhỏ nên chưa tạo khác biệt rõ về hấp thụ). So với đường “Mix LAMP” (đen), hai đường này hơi thay đổi cường độ nhưng vẫn giữ hình dạng chung, cho thấy việc thêm mẫu sinh học không làm xuất hiện chromophore mới nào đáng kể ngay tại thời điểm ban đầu.

Khi thời gian ủ tăng (20, 30, 40 phút), các đường “Positive 20 min” (xanh lam), “Positive 30 min” (cyan) và “Positive 40 min” (tím) đều tăng rõ rệt cường độ hấp thụ, đặc biệt ở đỉnh khoảng 260–270 nm. Cường độ tăng mạnh nhất tại 40 phút.

Sự tăng này phản ánh việc các sản phẩm LAMP (DNA mạch đôi, cấu trúc lồng cừ, vòng DNA...) được tạo ra với nồng độ ngày càng lớn, làm tăng số lượng bazơ nitơ hấp thụ UV trong dung dịch; đồng thời sự thay đổi trạng thái cấu trúc (từ mạch đơn sang mạch đôi, hình thái siêu xoắn) cũng làm thay đổi hệ số hấp thụ mol của các chromophore.

Đường “Negative 0 min” gần như giữ nguyên và không có loạt phổ theo thời gian, cho thấy ở mẫu âm không có khuếch đại DNA nên mật độ chất hấp thụ ở 260–270 nm không tăng đáng kể.

Như vậy, sự khác biệt rõ ràng giữa các phổ positive theo thời gian và phổ negative chứng minh rằng phổ UV–Vis có thể dùng để xác nhận sự hình thành sản phẩm LAMP: mẫu dương cho tín hiệu hấp thụ tăng dần, trong khi mẫu âm không thay đổi.

Kết quả phổ hấp thụ cũng có cơ chế đã nêu cho phép đo OCP: khi phản ứng LAMP diễn ra, không chỉ tạo ra H^+ làm giảm pH mà còn đồng thời sinh nhiều sản phẩm DNA, thể hiện qua sự tăng hấp thụ ở 260–270 nm. Do đó, phổ UV–Vis đóng vai trò bằng chứng độc lập rằng phản ứng LAMP trong mẫu dương thực sự xảy ra và tiến triển theo thời gian, giải thích hợp lý cho sự dịch chuyển thế mạch hở của điện cực rGO-PANi quan sát được trong thí nghiệm.

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.

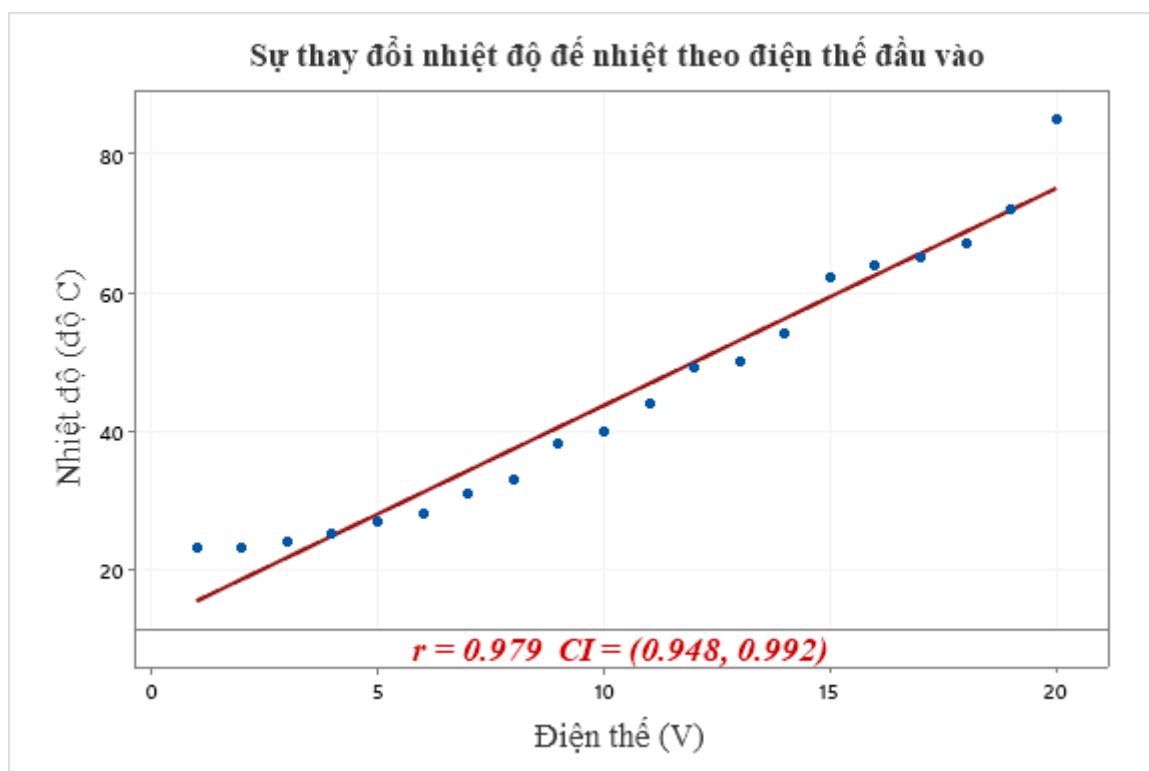
- Lớp hấp phụ rGO với độ dẫn điện cao và độ nhạy pH nội tại đã góp phần vào độ nhạy nâng cao tổng thể của bề mặt cảm biến.

- Giá trị OCP giảm 27 mV được tìm thấy khi khuếch đại gen 103 lần.

- Việc kết hợp hệ thống vi lưu và cấu hình microarray sẽ được thực hiện trong các hoạt động tiếp theo để phát hiện đồng thời các mầm bệnh trong các thiết bị xét nghiệm tại chỗ POC.

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

Sử dụng máy đo nhiệt độ hồng ngoại và hệ đo 4 đầu dò, tôi tiến hành kiểm tra khả năng hoạt động của nhiệt điện trở platin được in trên đế kính của thiết bị.



Hình 3.19. Sự phụ thuộc của điện trở và điện thế

Nhiệt độ	Điện thế	Số mẫu	Hệ số tương quan	95% CI for ρ	P-Value
C_2	C_1	20	0.979	(0.948, 0.992)	0.000

Biểu đồ thể hiện mối quan hệ giữa điện thế cấp vào để nhiệt (V) và nhiệt độ đạt được trên đế ($^{\circ}\text{C}$).

Hình dạng đường cong và ý nghĩa thực nghiệm

- Các điểm màu xanh là giá trị đo thực nghiệm: khi tăng điện thế từ khoảng 2–3 V lên 20 V, nhiệt độ tăng từ $\sim 20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ lên hơn 80°C .

- Đường thẳng màu đỏ là đường hồi quy tuyến tính được fit qua tập dữ liệu; độ dốc dương cho thấy điện thế càng cao thì đế nhiệt càng nóng, đúng với cơ chế gia nhiệt điện trở (công suất $P \sim V^2/R$).

Hệ số tương quan r và R^2

- Hệ số tương quan Pearson $r = 0,979$ với khoảng tin cậy $\text{CI} = (0,948; 0,992)$. Giá trị r rất gần 1 cho thấy mối quan hệ gần như tuyến tính giữa điện thế và nhiệt độ trong dải đo.

Hệ số xác định tuyến tính R^2 chính là r^2 trong trường hợp hồi quy tuyến tính đơn: $R^2 = r^2 \approx 0,979^2 \approx 0,958$. Nghĩa là khoảng 95,8% độ biến thiên của nhiệt độ đo được được giải thích bởi sự thay đổi điện thế theo mô hình tuyến tính; chỉ khoảng 4,2% do nhiễu, sai số đo, hoặc các yếu tố phi tuyến (tản nhiệt, thay đổi điện trở theo nhiệt độ...).

Đánh giá độ tin cậy của mô hình tuyến tính

- Khoảng tin cậy rất hẹp của r (0,948–0,992) cho thấy nếu lặp lại thí nghiệm nhiều lần, hệ số tương quan vẫn sẽ cao, mô hình tuyến tính ổn định.

- Do R^2 xấp xỉ 0,96, có thể sử dụng phương trình đường thẳng ($T = a \cdot V + b$) như phương trình hiệu chuẩn để suy ra nhiệt độ đế chỉ từ giá trị điện thế đặt, với sai số tương đối nhỏ; điều này đặc biệt hữu ích khi vận hành đế nhiệt trong chip vi lưu mà không thể gắn cảm biến nhiệt trực tiếp vào mỗi mẫu.

Ta thấy nhiệt độ của phần nhiệt điện trở thay đổi gần như tuyến tính theo điện thế đầu vào, phù hợp lý thuyết với phương trình hồi quy $C_2 = 12.26 + 3.137 \times C_1$ ($R^2 = 95.8\%$). Sử dụng phương trình trên, ta có thể kiểm soát được nhiệt độ nhiệt điện trở bằng cách thay đổi điện thế đầu vào.

3.4. Kết luận

Trong phần nghiên cứu này, tôi đã tìm hiểu ưu nhược điểm của những vấn đề cơ bản liên quan như phương pháp thiết kế - chế tạo, lựa chọn vật liệu, khả năng tích hợp của thiết bị vi lưu để giảm tải nguyên cần dùng trong thí nghiệm.

Từ những tìm hiểu đó, tôi đã đề xuất và phát triển hoàn thiện một thiết bị vi lưu tích hợp phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP và phát hiện điện hóa.

Đề nhiệt được kiểm tra và hoạt động tốt, đạt tới ngưỡng nhiệt độ cần thiết cho phản ứng LAMP (60-65°C) với nguồn 15 – 17 V. Đây là tiền đề để NCS hoàn thiện thiết bị vi lưu tích hợp, hướng đến sử dụng trong khuếch đại đẳng nhiệt mạch vòng LAMP, phục vụ cho phát hiện điện hóa các phân tử sinh học xác định.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

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 thực hiện và đạt được các kết quả chính sau đây

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, cho phép đưa ra kết luận chẩn đoán mẫu. Toàn bộ quy trình – từ khuếch đại đến phân tích tín hiệu điện hoá – được thực hiện trong thời gian dưới 70 phút, nhanh hơn khoảng hai đến ba lần so với các quy trình PCR truyền thống. Kỹ thuật này có tiềm năng thay thế hoặc bổ trợ cho PCR thời gian thực và các hệ đo quang học phức tạp trong phát triển xét nghiệm tại điểm chăm sóc (POC), đặc biệt hữu ích ở những nơi hạn chế về trang thiết bị và nguồn lực.

Thiết kế chip đơn giản, nhiệt độ phản ứng tương đối thấp và khả năng định lượng mẫu trong thời gian ngắn tạo điều kiện để ứng dụng như một thiết bị POC không chỉ cho tầm soát nhanh HBV và các mầm bệnh khác mà còn cho chẩn đoán lâm sàng và các nghiên cứu khoa học đời sống; kết quả có ý nghĩa khoa học trong lĩnh vực hệ vi lưu tích hợp cảm biến sinh học.

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). Độ nhạy pH của lớp rGO-PANi đã được khảo sát và khai thác hiệu quả cho theo dõi phản ứng LAMP thông qua sự thay đổi 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. Trên cơ sở này, việc kết hợp với hệ vi lưu và cấu hình microarray được định hướng triển khai tiếp nhằm phát hiện đồng thời nhiều tác nhân gây bệnh trong các thiết bị xét nghiệm tại chỗ.

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. Để 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, đáp ứng yêu cầu vận hành của hệ tích hợp.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục thử nghiệm khả năng phát hiện các chỉ dấu sinh học và tác nhân gây bệnh khác nhau trên thiết bị tích hợp đã chế tạo với các mẫu bệnh phẩm thực, nhằm đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và độ tin cậy trong điều kiện ứng dụng. Các kết

quả cần được so sánh với kết quả xét nghiệm thu được từ những phương pháp chuẩn đang dùng tại bệnh viện và các trung tâm xét nghiệm.

2. Nghiên cứu triển khai các cấu trúc vi lưu đa kênh cho phép phát hiện đồng thời nhiều chỉ dấu sinh học trong một phép đo, qua đó đánh giá đáp ứng tín hiệu, khả năng tách kênh và độ ổn định của hệ trong chế độ đo đa thông số.

3. Phát triển hướng kết hợp kỹ thuật in 3D và điện cực mực in để đơn giản hoá quy trình chế tạo chip, tối ưu hoá cấu trúc và tạo tiền đề cho tự động hoá các bước chuẩn bị mẫu, thu thập và xử lý dữ liệu. Mục tiêu cuối cùng là tiến tới một mô hình “phòng thí nghiệm trên chip” (lab-on-a-chip) nhỏ gọn, chi phí thấp và dễ sử dụng.

DANH MỤC**CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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.
5. Bui Quang Tien, Nguyen Thy Ngoc, Nguyen Van Quynh, Nguyen Thai Loc, Vu Thi Thu, Tran Dai Lam, Electrochemical nanobiosensors for some typical infectious diseases in Viet Nam, *IWAMSN*, 2016, Halong, Vietnam.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. Lakhera, V. Chaudhary, A. Jha, R. Singh, P. Kush and P. Kumar, 2022, Recent developments and fabrication of the different electrochemical biosensors based on modified screen printed and glassy carbon electrodes for the early diagnosis of diverse breast cancer biomarkers, *Mater. Today Chem.*, 26, 101129.
- [2]. Y. Yang, Y. Qing, X. Hao, C. Fang, P. Ouyang, H. Li, Z. Wang, Y. Liao, H. Fang and J. Du, 2022, APTES-Modified Remote Self-Assembled DNA-Based Electrochemical Biosensor for Human Papillomavirus DNA Detection, *Biosensors*, 12, 449.
- [3]. Dai, Y., C.C. Liu, 2019, Recent Advances on Electrochemical Biosensing Strategies toward Universal Point-of-Care Systems, *Angewandte Chemie*, 131(36), p. 12483-12496.
- [4]. Thi Ngoc Diep Trinh and Nguyen Nhat Nam, 2024, Isothermal amplification-based microfluidic devices for detecting foodborne pathogens: a review, *Anal. Methods* 16, 8, 1150–1157.
- [5]. Rajakaruna SJ., Liu WB., Ding YB., Cao GW., 2017, Strategy and technology to prevent hospital-acquired infections: lessons from SARS, Ebola, and MERS in Asia and West Africa, *Mil Med Res*, 4(1), p.32.
- [6]. Hospenthal DR., Murray CK., 2011, Preface: guidelines for the prevention of infections associated with combat-related injuries, *Jtrauma*, 71(2 Suppl 2), s.197-201.
- [7]. Atencia J., Beebe DJ., 2005, Controlled microfluidic interfaces, *Nature*, 437 (7059), p.648-655.
- [8]. Sackmann EK., Fulton AL., Beebe DJ., 2017, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*, 507(7491), p.181–189.
- [9]. Bakas S., Uttamchandani D., Toshiyoshi H., Bauer R, 2021, MEMS enabled miniaturized light sheet microscopy with all optical control, *Sci Rep*, 11(1), p.14100.
- [10]. Syedmoradi L., Daneshpour M., Alvandipour M., Gomez FA., Hajghassem H., Omidfar K, 2017, Point of care testing: the impact of nanotechnology, *Biosens Bioelectron*, 87, p373–387.
- [11]. Jin YH., Zhan QY., Peng ZY., Ren XQ., Yin XT., Cai L, et al., 2020, Chemoprophylaxis, diagnosis, treatments, and discharge management of COVID-19: an evidence-based clinical practice guideline (updated version), *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 45, p.1003-1029.

- [12]. Guo YR., Cao QD., Hong ZS., Tan YY., Chen SD., Jin HJ., et al., 2020, The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status, *Mil Med Res*; 7(11).
- [13]. Jin YH., Huang Q., Wang YY., Zeng XT., Luo LS., Pan ZY., et al., 2020, Perceived infection transmission routes, infection control practices, psychosocial changes, and management of COVID-19 infected healthcare workers in a tertiary acute care hospital in Wuhan: a cross-sectional survey, *Mil Med Res*, 7(24).
- [14]. Telenti A., Arvin A., Corey L., Corti D., Diamond MS., García-Sastre A., et al., 2021, After the pandemic: perspectives on the future trajectory of COVID-19, *Nature*, 596(7873), p.495–504
- [15]. Fabiani L. et al., 2021, Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARSCoV-2 detection in saliva, *Biosensors and Bioelectronics*, 171, p. 112686.
- [16]. Pishva P. ,M. Yüce, 2021, Nanomaterials to tackle the COVID-19 pandemic, *Emergent materials*, p.1-19.
- [17]. Antiochia R., Nanobiosensors as new diagnostic tools for SARS, MERS and COVID-19: from past to perspectives, 2020, *Microchimica Acta*, 187(12), p. 1-13.
- [18]. Bai, Y., T. Xu, and X. Zhang, 2020, Graphene-based biosensors for detection of biomarkers, *Micromachines*, 11(1), p. 60.
- [19]. Chandra P., 2020, Miniaturized label-free smartphone assisted electrochemical sensing approach for personalized COVID-19 diagnosis, *Sensors International*, 1, p. 100019.
- [20]. Hussein H.A. et al., 2020, Point-of-care diagnostics of COVID-19: from current work to future perspectives, *Sensors*, 20(15), p. 4289.
- [21]. Tayyab, M., et al., 2020, Potential microfluidic devices for COVID-19 Antibody detection at Point-of-Care (POC): A Review, *IEEE Sensors Journal*, 21(4), p.4007-4017.
- [22]. Khan, M.Z., Hasan, M.R., Hossain, S.I. et al, 2020, Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: state of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, 166: 112431.
- [23]. Miku, E, 2021, Recent advancements in electrochemical biosensors for Alzheimer's disease biomarkers detection, *Current Medicinal Chemistry*, 28 (20):4049–4073.

- [24]. Valkova, P. and Pohanka, M, 2021, Novel trends in electrochemical biosensors for early diagnosis of Alzheimer's disease, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2021: 1–13.
- [25]. Ronkainen, N.J., Halsall, H.B., and Heineman, W.R, 2010, Electrochemical biosensors, *Chemical Society Reviews*, 39 (5): 1747–1763.
- [26]. Song Y, Ye Y, Su S-H, Stephens A, Cai T, Chung M-T, Han MK, Newstead MW, Yessayan L, Frame D, Humes HD, Singer BH, Kurabayashi K, 2021, A digital protein microarray for COVID-19 cytokine storm monitoring, *Lab Chip*, 21:331–343.
- [27]. Berlanda, S.F.; Breitfeld, M.; Dietsche, C.L.; Dittric, P.S., 2021, Recent advances in microfluidic technology for bioanalysis and diagnostics, *Anal. Chem.*, 93, p.311–331.
- [28]. Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2011.
- [29]. Berlanda, S.F.; Breitfeld, M.; Dietsche, C.L.; Dittric, P.S., 2021, Recent advances in microfluidic technology for bioanalysis and diagnostics, *Anal. Chem.*, 93, p.311–331.
- [30]. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H.M., 1990, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sens. Actuators B Chem.*, 1, p.244–248.
- [31]. Whitesides G.M., 2006, The origins and the future of microfluidics, *Nature*, 442, p.368–373.
- [32]. Patabadige, D.E.W.; Jia, S.; Sibbitts, J.; Sadeghi, J.; Sellens, K.; Culbertson, C.T., 2016, Micro total analysis systems: Fundamental advances and applications, *Anal. Chem.*, 88, p.320–338.
- [33]. Feng, X.; Du, W.; Luo, Q.; Liu, B.F., 2009, Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology, *Anal. Chim. Acta*, 650, p.83–97.
- [34]. Dou, M.; Dominguez, D.C.; Li, X.; Sanchez, J.; Scott, G., 2014, A versatile PDMS/Paper hybrid microfluidic platform for sensitive infectious disease diagnosis, *Anal. Chem.*, 86, p.7978–7986.
- [35]. Zhang, D.; Bi, H.; Liu, B.; Qiao, L., 2018, Detection of pathogenic microorganisms by microfluidics based analytical methods, *Anal. Chem.*, 90, p. 5512–5520.

- [36]. Nasser, B.; Soleimani, N.; Rabiee, N.; Kalbasi, A.; Karimi, M.; Hamblin, M.R., 2018, Point-of-care microfluidic devices for pathogen detection, *Biosens. Bioelectron.*, 117, p.112–128.
- [37]. Zhao, X.; Li, M.; Liu, Y., 2019, Microfluidic-based approaches for foodborne pathogen detection, *Microorganisms*, 7, p. 381.
- [38]. Asghar, W.; Sher, M.; Khan, N.S.; Vyas, J.M.; Demirci, U., 2019, Microfluidic chip for detection of fungal infections, *ACS Omega*, 2019, 4, p.7474–7481.
- [39]. Parihar, M., W N, N., Sahana, Biswas, R., Dehury, B., & Mazumder, N. (2025). Point-of-care biosensors for infectious disease diagnosis: recent updates and prospects. *RSC advances*, 15(36), 29267–29283.
- [40]. J. Wu , H. Liu , W. Chen , B. Ma and H. Ju , 2023, *Nat. Rev. Bioeng.*, 1 , 346 —360.
- [41]. Rasmi, Y., Li, X., Khan, J. et al., 2021, Emerging point-of-care biosensors for rapid diagnosis of COVID-19: current progress, challenges, and future prospects, *Anal Bioanal Chem*, 413, 4137–4159.
- [42]. Karbelkar AA, Furst AL, 2020, Electrochemical Diagnostics for Bacterial Infectious Diseases, *ACS Infectious Diseases*, 6:1567–1571.
- [43]. Pohanka, M., P. Skládál, 2008, Electrochemical biosensors--principles and applications, *Journal of applied biomedicine*, 6(2).
- [44]. Lui, C.; Cady, N.C.; Batt, C.A., 2009, Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems, *Sensors*, 9, p.3713–3744.
- [45]. Marinesco, S., 2018, Reference Module in Chemistry, *Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier.
- [46]. Otero, F. and E. Magner, 2020, Biosensors—recent advances and future challenges in electrode materials, *Sensors*, 20(12), p. 3561.
- [47]. Tian F, Liu C, Deng J, Han Z, Zhang L, Chen Q, et al., 2020, A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing, *Sci China Chem.*, 63(10), p.1498–1506.
- [48]. Xiong H, Ye X, Li Y, Wang L, Zhang J, Fang X, et al., 2020, Rapid differential diagnosis of seven human respiratory coronaviruses based on centrifugal microfluidic nucleic acid assay, *Anal Chem.*, 92(21), p.14297–14302.
- [49]. Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C., 2015, Isothermal amplification of nucleic acids, *Chem. Rev.*, 115, p. 12491–12545.

- [50]. Farhadi, S., A. Farmani, and A. Hamidi, Figure of merit enhancement of surface plasmon resonance biosensor based on Talbot effect, 2021, *Optical and Quantum Electronics*, 53(9), p.1- 13.
- [51]. PiPat Chooto, 2019, Cyclic Voltammetry and Its Applications, *Intech Open*.
- [52]. N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, 2018, “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry”, *J. Chem. Educ.*, 95 (2), p.197–206.
- [53]. Sharif S, Wang Y, Ye Z, Wang Z, Qiu Q, Ying S, et al., 2019, A novel impedimetric sensor for detecting LAMP amplicons of pathogenic DNA based on magnetic separation, *Sens Actuators B.*, 301, p.127051.
- [54]. Nesakumar, N., et al., 2019, Microfluidic electrochemical devices for biosensing, *Journal of Analysis and Testing*, 3(1), p. 3-18.
- [55]. Liu, Z., et al., 2018, Electrochemical sensor integrated microfluidic device for sensitive and simultaneous quantification of dopamine and 5-hydroxytryptamine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 273, p. 873-883.
- [56]. Su, F., K. Chakrabarty, and R.B. Fair, 2006, Microfluidics-based biochips: technology issues, implementation platforms, and design-automation challenges, *IEEE transactions on computeraided design of integrated circuits and systems*, 25(2), p. 211-223.
- [57]. Wu, Y., et al., 2014, A paper-based microfluidic electrochemical immunodevice integrated with amplification-by-polymerization for the ultrasensitive multiplexed detection of cancer biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics*, 52, p.180-187.
- [58]. Ruecha, N., et al., 2017, Paper-based digital microfluidic chip for multiple electrochemical assay operated by a wireless portable control system, *Advanced Materials Technologies*, 2(3), p. 1600267.
- [59]. Swensen, J.S., et al., 2009, Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor, *Journal of the American Chemical Society*, 131(12), p. 4262-4266.
- [60]. Rackus, D.G., et al., 2015, A digital microfluidic device with integrated nanostructured microelectrodes for electrochemical immunoassays, *Lab on a Chip*, 15(18), p. 3776-3784.
- [61]. Li, J., P.B. Lillehoj, 2021, Microfluidic magneto immunosensor for rapid, high sensitivity measurements of SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein in serum, *ACS sensors*, 2021, 6(3), p. 1270- 1278.

- [62]. Bunyakul, N., A.J. Baeumner, 2015, Combining electrochemical sensors with miniaturized sample preparation for rapid detection in clinical samples, *Sensors*, 15(1), p. 547-564.
- [63]. Yang, X., et al., 2012, Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices, *Lab on a Chip*, 12(2), p. 274-280.
- [64]. Lin, H.K., et al., 2010, Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells, *Clinical Cancer Research*, 16(20), p. 5011-5018.
- [65]. Helton, K.L., et al., 2008, Conditioning saliva for use in a microfluidic biosensor, *Lab on a Chip*, 8(11), p. 1847-1851.
- [66]. Yan, S., et al., 2014, Isolating plasma from blood using a dielectrophoresis-active hydrophoretic device, *Lab on a Chip*, 14(16), p. 2993-3003.
- [67]. Yakoh, A., et al., 2019, 3D capillary-driven paper-based sequential microfluidic device for electrochemical sensing applications, *ACS sensors*, 4(5), p.1211-1221.
- [68]. Laschi, S., et al., 2010, A new gravity-driven microfluidic-based electrochemical assay coupled to magnetic beads for nucleic acid detection. *Electrophoresis*, 31(22), p. 3727-3736.
- [69]. Liu, J., et al., 2017, Electrochemical microfluidic chip based on molecular imprinting technique applied for therapeutic drug monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 91, p. 714-720.
- [70]. Huynh, V.L., et al., 2020, Hollow Microfibers of Elastomeric Nanocomposites for Fully Stretchable and Highly Sensitive Microfluidic Immunobiosensor Patch, *Advanced Functional Materials*, 30(46), p. 2004684.
- [71]. T. M. Anh, S. V. Dzyadevych, M. C. Van, N. J. Renault, C. N. Duc, J. M. Chovelon, 2004, Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites, *Talanta*, 63, p. 365–370.
- [72]. T. M. Anh, S. V. Dzyadevych, N. Prieur, C. N. Duc, T. D. Pham, N. J. Renault, J. M. Chovelon, 2006, Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor, *Materials Science and Engineering C*, 26, p. 453–456.
- [73]. P. D. Tam, M. A. Tuan, N. V. Hieu, N. D. Chien, 2006, Impact parameters on hybridization process in detecting influenza virus (type A)

- using conductimetric-based DNA sensor, *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 41, p. 1567–1571.
- [74]. P. D. Tam, N. V. Hieu, N. D. Chien, L. A. Tuan, M. A. Tuan, 2009, DNA sensor development based on multi-wall carbon nanotubes for label-free influenza virus (type A) detection, *Journal of Immunological Methods*, 350, p. 118-124.
- [75]. P. D. Tam, M. A. Tuan, T. Q. Huy, L. A. Tuan, N. V. Hieu, 2010, Facile preparation of a DNA sensor for rapid herpes virus detection, *Materials Science and Engineering: C*, 30, p. 1145–1150.
- [76]. Chu Văn Tuấn, 2012, Nghiên cứu chế tạo dây nanopolyme dẫn bằng phương pháp điện hóa và ứng dụng, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- [77]. Nguyễn Thị Thủy, 2012, Cảm biến sinh học trên cơ sở transistor hiệu ứng trường FET, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- [78]. Phương Đình Tâm, 2009, Nghiên cứu chế tạo cảm biến DNA ứng dụng trong Y học và công nghệ thực phẩm, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- [79]. Trần Quang Huy, 2011, Nghiên cứu và phát triển bộ cảm biến miễn dịch để phát hiện virus gây bệnh, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- [80]. Trần Thị Luyến, 2017, Nghiên cứu phát triển cảm biến sinh học điện hóa trên cơ sở dây nano polypyrrole tích hợp hệ vi lưu, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- [81]. D. H. Tong, P. D. Tran, X. T. Tung Pham, V. B. Pham, T. T. Tuyen Le, M. C. Dang, C. J M Van Rijn, 2010, The nanofabrication of Pt nanowire arrays at the wafer-scale and its application in glucose detection, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1, p. 015011.
- [82]. L. H. Nguyen, H. B. Nguyen, N. T. Nguyen, T. D. Nguyen, D. L. Tran, 2012, Portable cholesterol detection with polyaniline-carbon nanotube film based interdigitated electrodes, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3, p. 015004.
- [83]. L. D. Tran, D. T. Nguyen, B. H. Nguyen, Q. P. Do, H. Le Nguyen, 2011, Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: Application for human papilloma virus, *Talanta*, 85, p. 1560–1565.

- [84]. L. D. Tran, B. H. Nguyen, N. V. Hieu, H. V. Tran, H. L. Nguyen, P. X. Nguyen, 2011, Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe₃O₄ nanoparticle based screen printed electrodes, *Materials Science and Engineering C*, 31, p. 477–485.
- [85]. B. H. Nguyen, L. D. Tran, Q. P. Do, H. Le Nguyen, N. H. Tran, P. X. Nguyen, 2013, Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor, *Materials Science and Engineering C*, 33(4), p. 2229–2234.
- [86]. Van Chuc N, Binh NH, Thanh CT, Tu N Van, Huy N Le, Dzung NT, Minh PN, Thu VT, Lam TD, 2016, Electrochemical Immunosensor for Detection of Atrazine Based on Polyaniline/Graphene, *Journal of Materials Science and Technology*, 32, p.539– 544
- [87]. Le TH, Trinh NT, Nguyen LH, Nguyen HB, Nguyen VA, Tran DL, Nguyen TD, 2013, Electrosynthesis of polyaniline-mutilwalled carbon nanotube nanocomposite films in the presence of sodium dodecyl sulfate for glucose biosensing, *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*.
- [88]. Nguyen BH, Nguyen BT, Van Vu H, Van Nguyen C, Nguyen DT, Nguyen LT, Vu TT, Tran LD, 2016, Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film, *Current Applied Physics*, 16, p.135–140
- [89]. Nguyen HB, Nguyen VC, Nguyen VT, Le HD, Nguyen VQ, Ngo TTT, Do QP, Nguyen XN, Phan NM, Tran DL, 2013, Development of the layer-by-layer biosensor using graphene films: Application for cholesterol determination, *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*.
- [90]. Do PT, Do PQ, Nguyen HB, Nguyen VC, Tran DL, Le TH, Nguyen LH, Pham HV, Nguyen TL, Tran QH, 2014, A highly sensitive electrode modified with graphene, gold nanoparticles, and molecularly imprinted over-oxidized polypyrrole for electrochemical determination of dopamine, *Journal of Molecular Liquids*, 198, p.307–312
- [91]. Nguyen LH, Nguyen TD, Tran VH, Dang TTH, Tran DL, 2014, Functionalization of reduced graphene oxide by electroactive polymer for biosensing applications, *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*.
- [92]. Nguyen, M.B., Nga, D.T.N., Thu, V.T. et al., 2021, Novel nanoscale Yb-MOF used as highly efficient electrode for simultaneous detection of heavy metal ions, *J Mater Sci*, 56, p.8172–8185.

- [93]. Nguyen Thi Lien, Le Quoc Hung, Nguyen Tien Hoang, Vu Thi Thu, Dau Thi Ngoc Nga, Pham Thi Hai Yen, Pham Hong Phong, Vu Thi Thu Ha, 2020, An Electrochemical Sensor Based on Gold Nanodendrite/Surfactant Modified Electrode for Bisphenol A Detection, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, Article ID 6693595, 10 pages.
- [94]. Nguyen, M.B., Nga, D.T.N., Thu, V.T. et al, 2020, An electrochemical sensor based on copper-based metal–organic framework-reduced graphene oxide composites for determination of 2,4-dichlorophenol in water, *RSC Adv.*, 10, p.42212-42220
- [95]. Nhung, V.C., Tien, N.N., Nga, D.T.N. et al., 2022, Facile preparation of highly uniform and stable AuNPs/rGO-PEDOT:PSS hybrid film for electrochemical detection of pharmaceutical residue in water, *J Nanopart Res*, 34.
- [96]. Dau Thi Ngoc Nga, Giorgio Mattana, Vu Thi Thu, Ronan Roussel, Benoît Piro, 2022, A simple flexible printed capacitive pressure sensor for chronic wound monitoring, *Sensors and Actuators A: Physical*, 338.
- [97]. Lê Nguyên Ngân, 2021, Nghiên cứu chế tạo kênh dẫn vi lỏng bằng công nghệ in phun trên đế giấy ứng dụng trong cảm biến sinh học, Luận án Tiến sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG HCM.
- [98]. Gorganzhad, L.; Stratton, H.; Nguyen, N.T. , 2019, Microfluidic-based nucleic acid amplification systems in microbiology, *Micromachines*, 10, p.408.
- [99]. Zhu, H.; Zhang, H.; Xu, Y.; Lasakova, S.; Korabecna, M.; Neuzil, P., 2020, PCR past, present and future, *BioTechniques*, 69, p.317–325.
- [100]. Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C., 2015, Isothermal amplification of nucleic acids, *Chem. Rev.*, 115, p. 12491–12545.
- [101]. Pumford, E.A.; Lu, J.; Spaczai, I.; Prasetyo, M.E.; Zheng, E.M.; Zhang, H.; Kamei, D.T., 2020, Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics, *Biosens. Bioelectron*, 170, p.112674.
- [102]. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T., 2000, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res*, 28, e.63.
- [103]. Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T., 2008, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nat. Protoc.*, 3, p.877–882.

- [104]. Zhang, X.; Lowe, S.B.; Gooding, J.J., 2014, Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Biosens. Bioelectron.*, 61, p.491–499.
- [105]. Mori, Y.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases, 2009, *J. Infect. Chemother.*, 15, p.62–69.
- [106]. Han, E.T., 2013, Loop-mediated isothermal amplification test for the molecular diagnosis of malaria, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 13, p. 205–218.
- [107]. Zhang L, Zhang Y, Wang C, Feng Q, Fan F, Zhang G, et al., Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection, *Anal Chem*, 86(20), p.10461–10466.
- [108]. Choi Y, Hwang JH, Lee SY., 2018, Recent trends in nanomaterials-based colorimetric detection of pathogenic bacteria and viruses, *Small Methods.*, 2(4), 1700351.
- [109]. Wang, C.; Lien, K.; Wu, J.; Lee, G., 2011, A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification, *Lab Chip*, 11, p.1521–1531.
- [110]. Lu, W.; Wang, J.; Wu, Q.; Sun, J.; Chen, Y.; Zhang, L.; Zheng, C.; Gao, W.; Liu, Y.; Jiang, X., 2016, High-throughput sample-to-answer detection of DNA/RNA in crude samples within functionalized micro-pipette tips, *Biosens. Bioelectron.*, 75, p.28–33.
- [111]. Singleton, J.; Osborn, J.L.; Lillis, L.; Hawkins, K.; Guelig, D.; Price, W.; Johns, R.; Ebels, K.; Boyle, D.; Weigl, B.; et al., 2014, Electricity-free amplification and detection for molecular point-of-care diagnosis of HIV-1, *PLoS ONE*, 9, e.113693.
- [112]. Yang, M.; Tang, Y.; Qi, L.; Zhang, S.; Liu, Y.; Lu, B.; Yu, J.; Zhu, K.; Li, B.; Du, Y., 2021, SARS-CoV-2 Point-of-Care (POC) diagnosis based on commercial pregnancy test strips and a palm-size microfluidic device, *Anal. Chem.*, 93, p.11956–11964.
- [113]. Ma, Y.D.; Luo, K.; Chang, W.H.; Lee, G.B., 2018, A microfluidic chip capable of generating and trapping emulsion droplets for digital loop-mediated isothermal amplification analysis, *Lab Chip*, 18, p.296–303.
- [114]. Cate, D.M.; Dungchai, W.; Cunningham, J.C.; Volckens, J.; Henry, C.S., 2013, Simple, distance-based measurement for paper analytical devices, *Lab Chip*, 13, p.2397.

- [115]. Hongwarittorn, I.; Chaichanawongsaroj, N.; Laiwattanapaisal, W., 2017, Semi-quantitative visual detection of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-generated DNA by distance-based measurement on a paper device, *Talanta*, 175, p.135–142.
- [116]. Liu, D.; Shen, H.; Zhang, Y.; Shen, D.; Zhu, M.; Song, Y.; Zhu, Z.; Yang, C., 2021, A microfluidic-integrated lateral flow recombinase polymerase amplification (MI-IF-RPA) assay for rapid COVID-19 detection, *Lab Chip*, 21(10), p.2019-2026.
- [117]. Trinh, K.T.L.; Stabler, R.A.; Lee, N.Y., 2020, Fabrication of a foldable all-in-one point-of-care molecular diagnostic microdevice for the facile identification of multiple pathogens, *Sens. Actuators B Chem.*, 314, p.128057.
- [118]. Kim, Y.; Abafogi, A.T.; Tran, B.M.; Kim, J.; Lee, J.; Chen, Z.; Bae, P.K.; Park, K.; Shin, Y.B.; van Noort, D., et al., 2020, Integrated microfluidic preconcentration and nucleic amplification system for detection of influenza A virus H1N1 in saliva, *Micromachines*, 11, p.203.
- [119]. Li, Z.; Ju, R.; Sekine, S.; Zhang, D.; Zhuanga, S.; Yamaguchi, Y., 2019, All-in-one microfluidic device for on-site diagnosis of pathogens based on an integrated continuous flow PCR and electrophoresis biochip, *Lab Chip*, 19, p.2663.
- [120]. Fernández-Carballo, B.L.; McBeth, C.; McGuinness, I.; Kalashnikov, M.; Baum, C.; Borrós, S.; Sharon, A.; Sauer-Budge, A.F., 2018, Continuous-flow, microfluidic, qRT-PCR system for RNA virus detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, p.33–43.
- [121]. Yang, M.; Tang, Y.; Qi, L.; Zhang, S.; Liu, Y.; Lu, B.; Yu, J.; Zhu, K.; Li, B.; Du, Y., 2021, SARS-CoV-2 Point-of-Care (POC) diagnosis based on commercial pregnancy test strips and a palm-size microfluidic device, *Anal. Chem.*, 93, p.11956–11964.