

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thu Thảo

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC APTAMER ĐẶC HIỆU ỨNG DỤNG
TRONG KỸ THUẬT SẮC KÝ MIỀN DỊCH VÀ ELISA TRỰC TIẾP
NHÀM PHÁT HIỆN *Pseudomonas aeruginosa* VÀ *Klebsiella
pneumoniae***

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9 42 01 16

Hà Nội – 2026

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

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Trương Thị Ngọc Liên

Người hướng dẫn khoa học 2: GS.TS. Trần Đại Lâm

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

Phản biện 2: TS. Lã Thị Huyền

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện,
họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và
Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ. , ngày tháng năm 2026

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

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

1. **Pham, Thu Thao**, Thien-Kim Le, Nguyen TT Huyen, Nam Luyen Van, Tin Phan Nguy, Dai Lam Tran, and Lien Truong TN. "Staining-enhanced peroxidase-mimicking gold nanoparticles in nano-ELISA for highly sensitive detection of *Klebsiella pneumoniae*." *ACS omega* 8, no. 51 (2023): 49211-49217. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07503>
2. **Pham, Thu Thao**, Nguyen TT Huyen, Lam Dai Tran, and TN Lien Truong. "Lateral flow immunoassay combined with color saturation for smartphone-based quantitative point-of-care detection of *Klebsiella pneumoniae*." *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 16, no. 1 (2025): 015016. DOI 10.1088/2043-6262/ada006
3. **Pham, Thu Thao**, Nguyen TT Huyen, Le Hong Oanh, Lam Dai Tran, Hiep V. Tran, TN Lien Truong, and Nguyen Thi Phuong Trang. "A Novel Aptamer Selection Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* and Its Application as a Detecting Probe in a Nhanh Lateral Flow Assay." *Molecules* 30, no. 17 (2025): 3499. <https://doi.org/10.3390/molecules30173499>
4. Tran, Thuy-Duong Thi, Hai Ly Nguyen, Phan Thi Ngoc Hoa, **Thu Thao Pham**, Nguyen Thi Thanh Huyen, Giang Dau Huong, Hoa Thi Hoang et al. "Accelerated aptamer selection via SELEX and molecular simulations for lipopolysaccharide detection." *RSC advances* 15, no. 55 (2025): 46790-46806. DOI: [10.1039/D5RA06759F](https://doi.org/10.1039/D5RA06759F)

MỞ ĐẦU

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã tuyên bố rằng khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh là một trong những thách thức nghiêm trọng nhất đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu. Trong nhóm các vi khuẩn đa kháng thuốc (MDR) phổ biến nhất được định nghĩa theo nhóm ‘ESKAPE’, hai tác nhân Gram âm là *Klebsiella pneumoniae* (KP) và *Pseudomonas aeruginosa* (PA) chiếm tỷ lệ đáng kể trong các ca nhiễm trùng bệnh viện. Chúng được Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC) và WHO đánh giá là mối nguy cấp thiết do tốc độ lan rộng và khả năng tồn tại bền bỉ trong môi trường. Việc phát hiện kịp thời và định lượng chính xác các vi sinh vật này không chỉ có ý nghĩa trong chẩn đoán lâm sàng mà còn là yếu tố then chốt để thiết kế các phương pháp kiểm soát dịch tễ hiệu quả.

Trong những năm gần đây, aptamer – các sợi DNA hoặc RNA đơn ngắn (ssDNA/ssRNA) có khả năng liên kết đặc hiệu với mục tiêu với ái lực và tính chọn lọc cao – đã nổi lên như một công cụ sinh học tiềm năng bổ trợ cho kháng thể truyền thống. Với những đặc tính ưu việt như độ bền nhiệt cao, dễ sửa đổi cấu trúc và chi phí sản xuất thấp, aptamer đang được ứng dụng rộng rãi trong phát triển các cảm biến sinh học (biosensors) thế hệ mới. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về việc chọn lọc aptamer đặc hiệu cho các chủng vi khuẩn bản địa PA và KP vẫn còn hạn chế. Đặc biệt, việc tích hợp các aptamer này vào các nền tảng chẩn đoán hiện đại như sắc ký miễn dịch (LFIA) hay công nghệ ELISA một bước kết hợp vật liệu nano để tối ưu hóa khả năng định lượng nhanh vẫn là một bài toán khoa học đầy thách thức.

Xuất phát từ thực tiễn đó, luận án: **“Nghiên cứu sàng lọc aptamer đặc hiệu ứng dụng trong kỹ thuật sắc ký miễn dịch và ELISA trực tiếp nhằm phát hiện *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*”** được thực hiện. Luận án hướng tới việc làm chủ công nghệ chọn lọc Aptamer đặc hiệu, đồng thời linh hoạt kết hợp với các công cụ miễn dịch và nano-vật

liệu để phát triển hệ thống phát hiện có độ nhạy cao, góp phần giảm gánh nặng chi phí điều trị và nâng cao chất lượng chẩn đoán y tế.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án:

- Chọn lọc được các trình tự aptamer có ái lực cao, đặc hiệu với hai vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*.
- Phát triển kỹ thuật ELISA trực tiếp cho phép phát hiện vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* với độ nhạy cao.
- Phát triển kỹ thuật sắc ký miễn dịch cho phép phát hiện nhanh vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* với độ nhạy cao.

Nội dung nghiên cứu chính của luận án:

- Chọn lọc và đánh giá ái lực của aptamer đặc hiệu đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae*.
- Phát triển kỹ thuật ELISA trực tiếp dựa trên cộng hợp đầu thu sinh học và hạt nano vàng nhằm mục tiêu phát hiện vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*.
- Thiết kế và chế tạo que thử sắc ký miễn dịch (LFIA) để phát hiện nhanh vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Nhiễm khuẩn bệnh viện và hai tác nhân mục tiêu *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*

Nhiễm khuẩn bệnh viện (HAIs) là nguyên nhân quan trọng làm tăng tỷ lệ mắc bệnh, tử vong, kéo dài thời gian nằm viện và tạo gánh nặng kinh tế lớn, đặc biệt tại các khoa hồi sức và ở các quốc gia thu nhập thấp–trung bình. Các tác nhân gây HAIs phổ biến gồm nhiều vi khuẩn Gram dương và Gram âm, trong đó *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* đóng vai trò nổi bật. Tình trạng kháng kháng sinh, đặc biệt là kháng carbapenem ở các vi khuẩn ưu tiên của WHO, đang gia tăng mạnh tại Việt Nam, đặt ra yêu cầu cấp bách về tăng cường giám sát, chẩn đoán và phát triển các chiến lược điều trị mới.

1.2. Aptamer – thụ thể sinh học tiềm năng trong chẩn đoán vi khuẩn

Aptamer là thụ thể sinh học tổng hợp có độ đặc hiệu và ái lực cao với mục tiêu, được chọn lọc thông qua các chiến lược SELEX và các biến thể của kỹ thuật này. So với kháng thể, aptamer có ưu điểm nổi bật như khả năng tổng hợp nhân tạo, độ bền cao, dễ biến đổi hóa học và chi phí thấp. Nhờ những đặc tính này, aptamer ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong phát triển các cảm biến sinh học và xét nghiệm miễn dịch nhanh. Do đó, aptamer được xem là hướng tiếp cận đầy tiềm năng trong chẩn đoán nhanh các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện.

1.3. Xu hướng phát triển các phương pháp phát hiện vi khuẩn nhanh dựa trên LFIA và nano-ELISA

LFIA là kỹ thuật xét nghiệm nhanh dựa trên sự kết hợp giữa cơ chế sắc ký mao dẫn và phản ứng sinh hóa đặc hiệu, sử dụng kháng thể hoặc axit nucleic (như aptamer) làm đầu thu sinh học. Một que thử LFIA điển hình gồm bốn thành phần chính: tấm đệm mẫu, tấm cộng hợp, màng nitrocellulose

và tẩm hút mẫu, mỗi bộ phận đảm nhiệm vai trò riêng nhằm đảm bảo dòng chảy ổn định và phản ứng đặc hiệu. LFIA thường được triển khai theo hai định dạng phổ biến là sandwich (dành cho phân tử lớn) và cạnh tranh (dành cho phân tử nhỏ), với cơ chế tạo tín hiệu khác nhau để xác định kết quả dương tính hoặc âm tính. Các vật liệu đánh dấu trong LFIA rất đa dạng, trong đó hạt nano vàng được sử dụng rộng rãi nhất nhờ tính chất quang học nổi bật, độ ổn định cao và khả năng quan sát bằng mắt thường. Bên cạnh LFIA, sự phát triển của nano-ELISA sử dụng nanozyme và hạt nano vàng thay thế enzyme truyền thống đã cho thấy tiềm năng vượt trội trong nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu và tính ứng dụng của các xét nghiệm miễn dịch hiện đại.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu, nguyên liệu và thiết bị

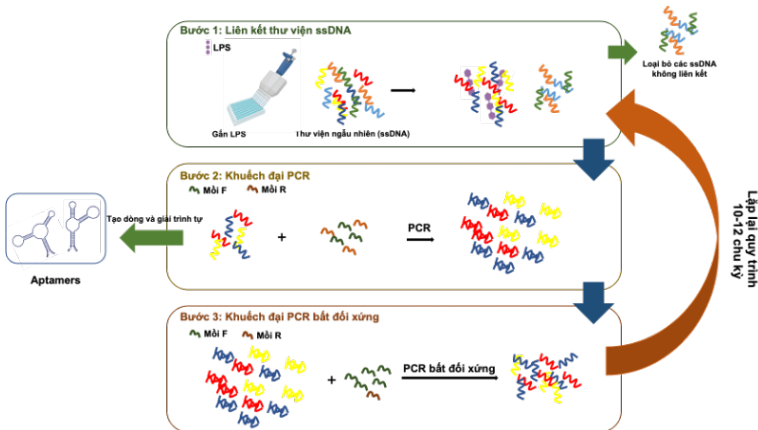
Đối tượng nghiên cứu là hai chủng vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* (đã bất hoạt), cùng với các chủng vi khuẩn khác được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu của aptamer.

Các vật liệu và hóa chất phục vụ quá trình chọn lọc aptamer bao gồm thư viện ssDNA ngẫu nhiên, hệ môi gắn biotin/FAM, hạt từ streptavidin, các dung dịch đệm cho quá trình chọn lọc SELEX, hóa chất PCR và kit tinh sạch DNA. Bên cạnh đó, các vật liệu cho phát triển hệ sắc ký miễn dịch (LFIA), Nano-ELISA và tổng hợp hạt nano vàng (AuNPs) bao gồm các tấm để lắp ráp que thử, thành phần dung dịch đệm, TMB và H_2O_2 . Các thiết bị chính gồm hệ PCR, máy đo UV–Vis, Zetasizer, TEM, và các thiết bị nuôi cấy vi sinh.

2.2. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *Klebsiella pneumoniae*

Quy trình chọn lọc aptamer được thực hiện theo phương pháp SELEX tăng tốc, gồm ba giai đoạn chính. Giai đoạn trước chọn lọc tập trung vào thiết kế thư viện ssDNA với vùng ngẫu nhiên 55 nucleotide nhằm đảm bảo sự cân bằng giữa đa dạng cấu trúc và khả năng gắn đặc hiệu. Hệ môi được thiết kế để tránh hiện tượng dimer hóa và đảm bảo hiệu suất PCR cao. Thư viện DNA được cố định và tách ssDNA bằng hạt từ streptavidin thông qua liên kết biotin–streptavidin. Giai đoạn chọn lọc SELEX tăng tốc được tiến hành trên nền đĩa ELISA phủ kháng nguyên/LPS của *K. pneumoniae*. Sự làm giàu aptamer được theo dõi thông qua định lượng ssDNA trước và sau chọn lọc, kết hợp điện di agarose và PCR. Sau vòng chọn lọc cuối cùng, các trình tự aptamer được khuếch đại, tạo dòng, giải trình tự và phân tích sinh tin học.

Các trình tự đại diện được lựa chọn dựa trên tần suất xuất hiện và độ ổn định cấu trúc thứ cấp.



Hình 2.1. Quy trình chọn lọc aptamer cho kháng nguyên *Klebsiella pneumoniae*

Cấu trúc bậc hai và bậc ba của aptamer được dự đoán bằng các công cụ mFold và RNAComposer, sau đó chuyển đổi sang dạng DNA và tối ưu năng lượng. Tương tác giữa aptamer và lipopolysaccharide (LPS) của *K. pneumoniae* được khảo sát bằng mô phỏng ghép nối phân tử và động lực học phân tử. Các tham số như RMSD, RMSF, liên kết hydro và năng lượng tự do liên kết được sử dụng để đánh giá độ ổn định của phức hợp aptamer-LPS. Song song đó, các kỹ thuật thực nghiệm như ELONA, SERS, phổ trở kháng điện hóa (EIS) và voltammetry xung vi phân (DPV) được sử dụng để xác nhận tương tác đặc hiệu và xác định hằng số phân ly (K_d) của aptamer.

2.3. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *Pseudomonas aeruginosa*

Quy trình SELEX cho *P. aeruginosa* được thực hiện theo hướng cell-SELEX, trong đó thư viện ssDNA được ủ trực tiếp với tế bào vi khuẩn bất hoạt. Aptamer gắn đặc hiệu được thu hồi sau các bước rửa và giải phóng nhiệt, sau đó khuếch đại bằng PCR và PCR bất đối xứng. Độ nghiêm ngặt

của quá trình chọn lọc được tăng dần qua các vòng. Các aptamer thu được được giải trình tự, phân tích cấu trúc và đánh giá tính đặc hiệu với các chủng vi khuẩn khác.

2.4. Quy trình ELISA trực tiếp phát hiện *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*

Vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* ở các nồng độ khác nhau được cố định trên đĩa polystyrene, sau đó lần lượt tiến hành các bước chặn, ủ với cộng hợp AuNPs–kháng thể (đối với *Klebsiella pneumoniae*), với cộng hợp AuNPs–aptamer (đối với *Pseudomonas aeruginosa*), nhuộm tăng cường bằng HAuCl₄/NH₂OH·HCl và phản ứng sinh màu với TMB/H₂O₂. Tín hiệu được đo tại bước sóng 650 nm. Độ nhạy, giới hạn phát hiện (LoD), giới hạn định lượng (LoQ) và độ đặc hiệu của phương pháp được xác định thông qua các mẫu âm tính và các chủng vi khuẩn đối chứng.

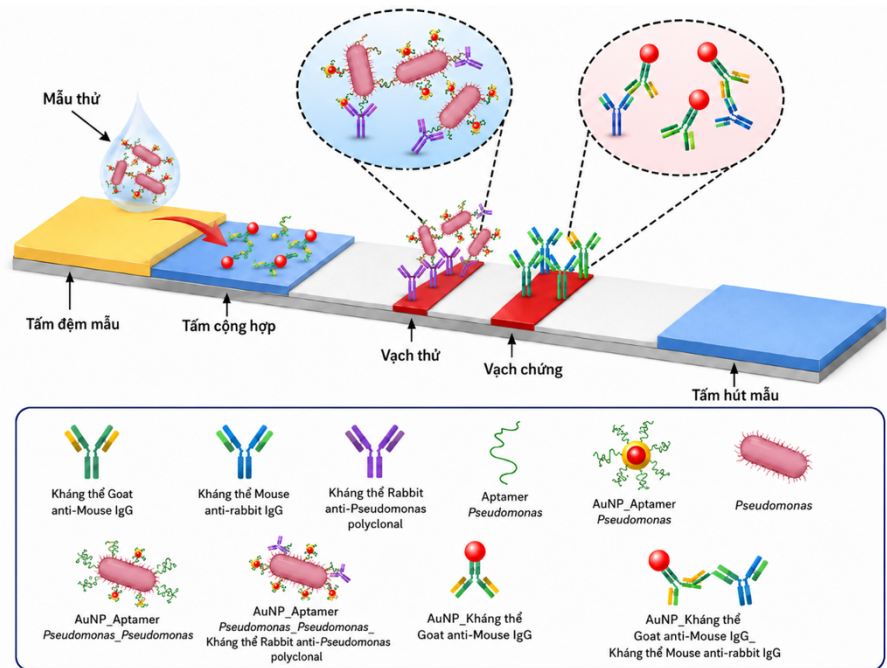
2.5. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện *Klebsiella pneumoniae*

Que thử LFIA được thiết kế theo nguyên lý sandwich miễn dịch, gồm bốn thành phần chính: màng hút mẫu, màng liên hợp, màng nitrocellulose và màng hấp thụ. Các màng được xử lý bằng hệ đệm phù hợp nhằm đảm bảo dòng mao dẫn ổn định và giảm nhiễu nền. Kháng thể đa dòng kháng *Klebsiella pneumoniae* và kháng thể đối chứng IgG được phun lần lượt lên vạch thử (T) và vạch đối chứng (C). Kết quả xét nghiệm được đọc sau 15 phút và được định lượng thông qua đo độ bão hòa màu của vạch thử bằng camera điện thoại thông minh kết hợp ứng dụng phân tích màu.

2.6. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện *Pseudomonas aeruginosa*

Que thử nhanh phát hiện *Pseudomonas aeruginosa* hoạt động dựa trên nguyên lý cộng hợp kép aptamer–kháng thể, nhằm tăng độ đặc hiệu và độ tin cậy của phép thử. Trong bước chuẩn bị mẫu, aptamer đặc hiệu được gắn lên hạt vàng nano tạo thành đầu dò AuNPs–aptamer, có khả năng nhận diện và

gắn chọn lọc với vi khuẩn mục tiêu trong mẫu. Khi mẫu chứa vi khuẩn được nhỏ lên que thử, phức hợp AuNPs–aptamer–vi khuẩn di chuyển theo dòng mao dẫn trên màng nitrocellulose và bị bắt giữ tại vạch T nhờ kháng thể đặc hiệu cố định sẵn. Song song đó, hệ AuNPs – IgG được nạp sẵn tại vùng cộng hợp sẽ di chuyển và được giữ lại tại vạch C thông qua tương tác miễn dịch với kháng thể anti- IgG. Hình ảnh của vùng vạch thử (T) và vạch đối chứng (C) trên các que thử LFIA được xử lý bằng phần mềm ImageJ nhằm định lượng cường độ tín hiệu màu.

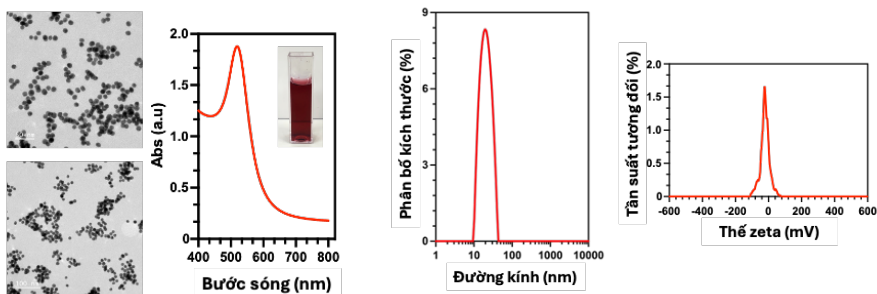


Hình 2.2. Cấu trúc về mặt nguyên tắc của que thử nhanh ứng dụng aptamer sử dụng cộng hợp kép phát hiện vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát tính chất của hạt nano vàng

Các hạt AuNP dạng keo đã được tổng hợp thành công trong huyền phù đơn phân tán bằng phương pháp khử citrate tiêu chuẩn. Trong nghiên cứu này, hạt nano vàng hình cầu đã tổng hợp được có kích thước trung bình là 15 ± 2 nm. Hình thái và một số tính chất quang- hóa của nó được xác nhận rõ ràng bằng phân tích DLS và ảnh TEM (**Hình 3.1**). Phổ hấp thụ UV-Vis của AuNP có đỉnh đặc trưng ở ~ 520 nm, và thế zeta là $-21,85$ mV (**Hình 3.1**). Kết quả cho thấy hạt AuNP tổng hợp có các đặc tính mong muốn, bao gồm kích thước đồng đều, hình cầu và điện tích bề mặt âm, rất phù hợp với các kỹ thuật phân tử sinh học.

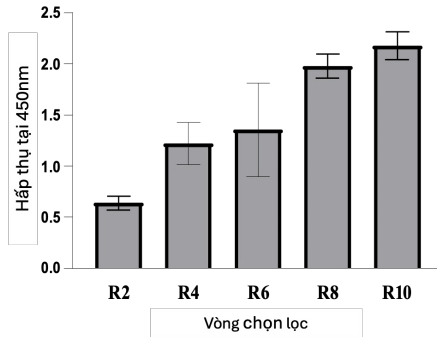


Hình 3.1. Hình ảnh TEM với thang đo 50 nm, 100 nm và phổ UV-Vis trong phạm vi bước sóng từ 400 đến 800 nm của hạt AuNP. Các phép đo tán xạ ánh sáng động (DLS) cho đường kính thủy động của các hạt nano vàng và điện thế Zeta của các hạt nano vàng.

3.2. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *Klebsiella pneumoniae*

Trong quy trình SELEX in vitro này, LPS từ *Klebsiella pneumoniae* được sử dụng làm mục tiêu cho một thư viện ssDNA ngẫu nhiên gồm 4^{55} phân tử ssDNA. Sau mười vòng tuyển chọn, một tập hợp các aptamer có ái lực liên kết được cải thiện rõ rệt đối với LPS đã được thu nhận thành công. Sự làm

giàu được thể hiện rõ ràng thông qua phép thử oligonucleotide gắn enzyme (enzyme-linked oligonucleotide assay): trong khi thư viện ban đầu chỉ cho tín hiệu hấp thụ yếu tại bước sóng 450 nm, cường độ tín hiệu tăng đáng kể từ vòng thứ 8 trở đi và gần như đạt trạng thái bão hòa ở vòng thứ 10 (**Hình 3.2**).



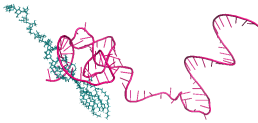
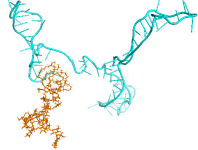
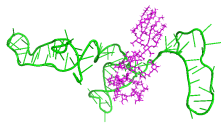
Hình 3.2. Quá trình làm giàu thư viện aptamer đặc hiệu với LPS từ *Klebsiella pneumoniae* trong SELEX

Để hỗ trợ cho kết quả SELEX thực nghiệm, một quy trình sàng lọc tính toán có hệ thống đã được thiết lập, bao gồm các bước docking phân tử, mô phỏng động lực học phân tử (MD) và phân tích số phối trí (CN). Tổng hợp các kết quả docking cho thấy aptamer No.5, aptamer No.7, và aptamer No.9 là những ứng viên tiềm năng, thể hiện sự cân bằng giữa năng lượng liên kết thuận lợi và hồ sơ tương tác đặc trưng.

Sau khi thu được các cấu hình docking, chúng tôi tiến hành mô phỏng động lực học phân tử (MD) nhằm đánh giá độ ổn định và các cấu dạng có lợi về mặt năng lượng của các phức hợp aptamer–LPS. Quy trình này cho thấy rằng ái lực liên kết không thể được suy luận chỉ từ một thông số đơn lẻ (ví dụ: năng lượng docking hoặc số lượng liên kết hydro), mà là kết quả của sự tương tác phức tạp giữa các yếu tố van der Waals, tĩnh điện, hòa tan và hiệu ứng entropy. Kết quả cho thấy, mặc dù aptamer No.9 thể hiện ưu thế về tần suất tiếp xúc và độ bền cấu trúc, nhưng aptamer No.5 lại đạt được năng lượng

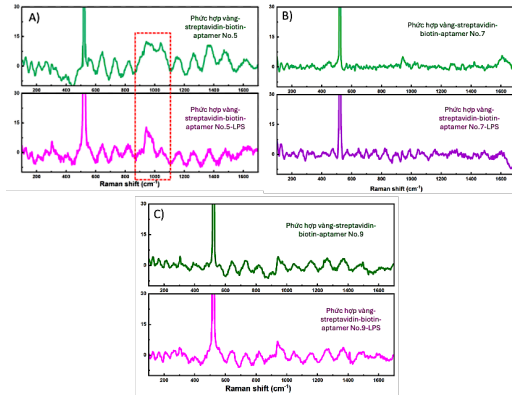
tự do liên kết thuận lợi hơn và hiệu quả nhận diện được xác nhận bằng thực nghiệm (**Bảng 3.1**).

Bảng 3.1. Cấu trúc ba chiều của ba phức hợp aptamer–LPS được lựa chọn (No.5, No.7, và No.9), cùng với các liên kết hydro giữa các cặp gốc của aptamer và LPS.

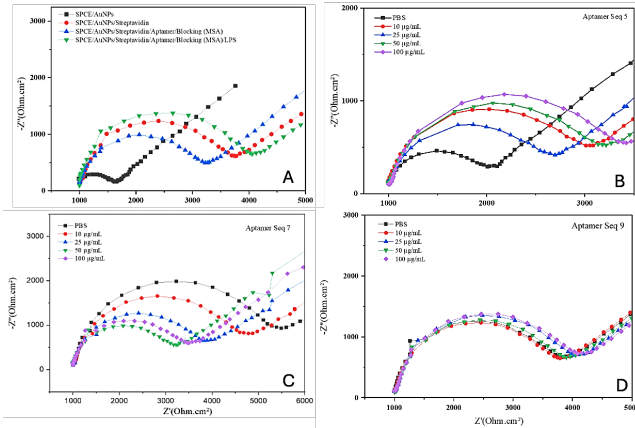
Trình tự aptamer	Cấu trúc phức hợp aptamer - LPS	Liên kết hydro	Năng lượng (kcal/mol)
No.5		T26 – KPLI (2 liên kết) T24 – KPLI G5 – BGA6	- 50,13
No.7		T61 – AHE4 G60 – BGL5 T44 – AKD12	- 49,3
No.9		T29 – BGA16 G57 – BGL11 G58 – AGA10 G61 – AKD2	- 44,27

Kết quả SERS cho thấy chỉ có aptamer No.5 thể hiện các thay đổi phổ rõ rệt — đặc trưng cho sự liên kết đặc hiệu với LPS — trong khi No.7 và No.9 không cho thấy biến đổi tương tự. Sự khác biệt này gợi ý rằng, mặc dù cả ba aptamer đều có thể gắn kết với LPS thông qua tương tác tĩnh điện, chỉ aptamer No.5 mới hình thành được một tương tác ổn định và thuận lợi về mặt cấu trúc (**Hình 3.3**). Các thay đổi về trở kháng điện được ghi nhận khi xảy ra quá trình gắn kết với LPS. Cụ thể, aptamer No.5 thể hiện sự tăng rõ rệt về trở kháng, trong khi No.7 lại cho thấy xu hướng giảm trở kháng. Ngược lại, đáp ứng trở kháng của No.9 hầu như không thay đổi khi có mặt LPS, cho thấy khả năng

tương tác yếu. Các kết quả này gợi ý rằng trong số các trình tự được thử nghiệm, aptamer No.5 có độ ái lực liên kết mạnh và ổn định nhất đối với LPS, trong khi No.7 cho phản ứng không điển hình và No.9 biểu hiện ái lực rất thấp (Hình 3.4).



Hình 3.3. Phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) của các aptamer được lựa chọn trước và sau khi tương tác với LPS từ *Klebsiella pneumoniae*.

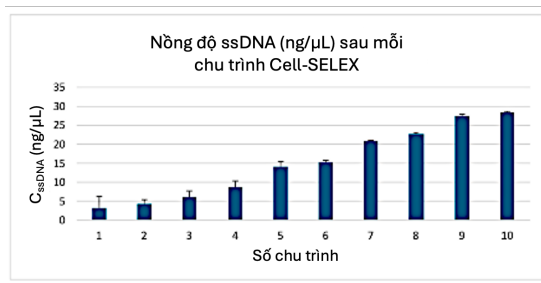


Hình 3.4. (A) Sơ đồ cơ chế của phép đo phổ trở kháng điện hóa (EIS). (B–D) Đồ thị Nyquist của các điện cực đã được cố định aptamer lần lượt No.5, No.7 và No.9 sau khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của LPS từ

Klebsiella pneumoniae (10, 25, 50 và 100 $\mu\text{g/mL}$), thể hiện đáp ứng trở kháng phụ thuộc vào nồng độ.

3.3. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *Pseudomonas aeruginosa*

Nồng độ của DNA sợi đơn (ssDNA) thu được sau mỗi vòng SELEX tăng dần theo thời gian, cho thấy sự làm giàu của các trình tự có ái lực liên kết cao hơn đối với *P. aeruginosa* (**Hình 3.5**). Chi tiết của quá trình tuyển chọn aptamer - bao gồm điểm docking, mô hình cấu trúc 2D/3D và hình ảnh tương tác docking - được trình bày trong **Bảng 3.2**.

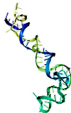
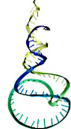


Hình 3.5. Biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ ssDNA qua các vòng SELEX toàn tế bào đối với *P. aeruginosa*.

Sau mười vòng SELEX toàn tế bào và quá trình chọn lọc đối kháng với *E. coli* và *K. pneumoniae* nhằm loại bỏ các trình tự liên kết không đặc hiệu, quần thể aptamer đã được làm giàu được nhân dòng bằng bộ kit TOPO TA Cloning®. Mười sáu khuẩn lạc trắng được chọn, sau đó tiến hành tách chiết plasmid và giải trình tự Sanger bằng môi phổ dụng M13. Kết quả phân tích trình tự cho thấy sáu chuỗi aptamer chiếm ưu thế, cho thấy sự hội tụ về các mô típ liên kết đặc hiệu. Sáu trình tự đại diện này tiếp tục được phân tích cấu trúc bậc hai bằng phần mềm Mfold [137], [138] và đánh giá ái lực liên kết phân tử bằng HDock [139] với vùng LPS trên bề mặt của *P. aeruginosa*.

Bảng 3.2. Đặc tính của các aptamer được lựa chọn, bao gồm trình tự nucleotide, điểm docking, năng lượng tự do tối thiểu dự đoán (ΔG), tần suất

(%), điểm đa dạng, cùng với các cấu hình cấu trúc hai chiều (2D), ba chiều (3D) và mô phỏng docking phân tử (MD) tương ứng, được xây dựng dựa trên mô hình năng lượng tự do tối thiểu (MFE) của sáu aptamer được chọn.

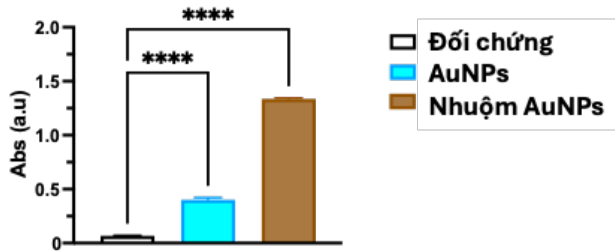
Tên aptamer	Trình tự DNA aptamer	Điểm docking	MFE (kcal/mol)	Tần suất (%)	Điểm đa dạng	Cấu trúc bậc ba (2D) dự đoán từ mô hình MFE	Cấu trúc bậc ba (3D) dự đoán từ mô hình MFE	Docking phân tử với CPA
T1	ATCCGTCACACCTGCTCTGTAAACACCTAC- GGTCTTAGCATAACGGTATAAGCCGTAAC- CGGTTTACCTAAACCTGGTGTGGCTCCCGTAT	-453.85	-27.10	24.98	4.64			
T2	ATCCGTCACACCTGCTCTCAAAAGGTCATA- GGGGCTCTTUGACAGCTAATCCCTTGC- TGCATTTTCCCTCATGGTGTGGCTCCCGTAT	-366.23	-22.11	3.82	28.74			
T3	ATCCGTCACACCTGCTCTCATCATGCC- CGGCTCTAATAACTGCTATATCTTTAT- CGGCTCTATCCCTCCGTTGGTGTGGCTCCCGTAT	-409.72	-12.20	8.83	13.74			

Trong số sáu aptamer được chọn, aptamer T1 là trình tự được phát hiện phổ biến nhất (xuất hiện trong 4 trên 16 khuẩn lạc), thể hiện tần suất cấu hình MFE cao nhất, điểm đa dạng thấp nhất, và điểm docking thuận lợi nhất với CPA của *P. aeruginosa*.

3.4. Phát triển kỹ thuật ELISA trực tiếp phát hiện *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*

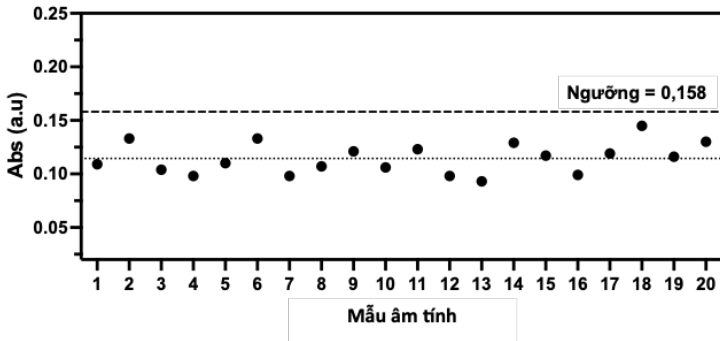
Các hạt nano vàng được khảo sát như một chất xúc tác peroxidase và TMB như một chất nền có thể tạo ra màu xanh lam trong H_2O_2 . Hoạt động của nanozyme đạt hiệu suất cao nhất ở 0,02 mg TMB và 150 μL H_2O_2 , vì màu xanh lam mạnh nhất tại các điểm đó sau 30 phút ủ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kiểm tra nồng độ $HAuCl_4$ và $NH_2OH.HCl$ nào được tối ưu hóa cho quy trình tăng cường nhuộm màu. Hoạt động của nanozyme đã được chứng minh là cho tín hiệu cao nhất ở nồng độ $HAuCl_4$ 2 mM và $NH_2OH.HCl$ 10 mM. **Hình 3.6** cho thấy AuNP có hoạt tính tăng cường nhuộm màu cao hơn đáng kể so với AuNP không nhuộm màu, cao hơn khoảng ba lần về mặt

thống kê. Kết quả này cho thấy nanozyme, sau khi được tăng cường nhuộm màu, có hoạt tính tốt hơn, và việc sử dụng tăng cường nhuộm màu là khả thi.

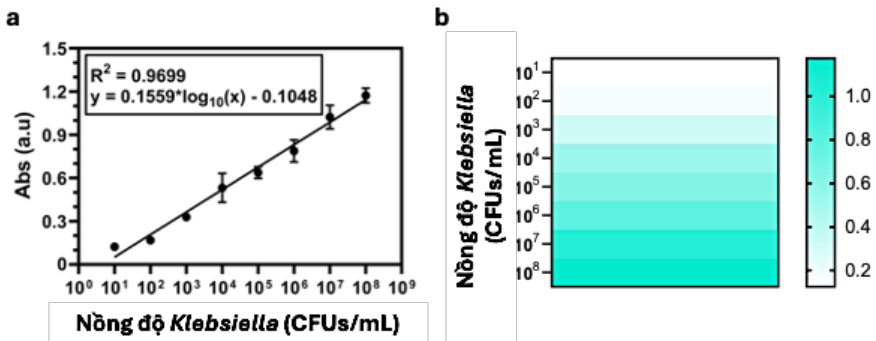


Hình 3.6. Đánh giá hoạt tính nanozyme của AuNPs và AuNPs có tăng cường nhuộm màu được đo bằng hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm.

Với sự tăng cường nhuộm, giá trị ngưỡng cao hơn ở mức 0,158 (**Hình 3.7**), xác định rằng các mẫu có giá trị OD cao hơn 0,158 được coi là dương tính, và các mẫu có OD thấp hơn được coi là âm tính. Nano-ELISA với sự tăng cường nhuộm đã được nghiên cứu bằng cách đo OD₆₅₀ để phát hiện vi khuẩn *Klebsiella pneumonia* từ 10¹ đến 10⁸ CFU/mL (**Hình 3.8**). Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định là $y = 0,1559\log_{10}(x) - 0,1048$. Đường cong thể hiện mối tương quan dương cao giữa nồng độ vi khuẩn *Klebsiella pneumonia* (CFUs/mL) và tín hiệu OD₆₅₀ ($R^2 = 0,9699$). LoD và LoQ được tính toán lần lượt là 36.230 và 78.857 CFU/mL. Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu có thể phát hiện nồng độ thấp tới 10² CFU/mL, cao hơn 100 lần so với Nano-ELISA với AuNP không tăng cường nhuộm.



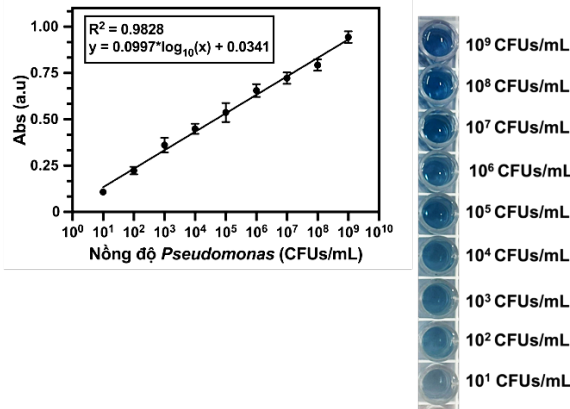
Hình 3.7. Xác định giá trị ngưỡng cho Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu.



Hình 3.8. Đường tuyến tính của vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* với nồng độ pha loãng nối tiếp từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (a) Bản đồ nhiệt độ màu xanh lam của phạm vi phát hiện vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (b) trong Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu.

Độ nhạy và phạm vi đáp ứng tuyến tính của xét nghiệm Nano-ELISA được nghiên cứu bằng cách đo OD₆₅₀ để phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* từ 10^1 đến 10^9 CFU/mL (**Hình 3.9**). Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định là $y = 0,0997\log_{10}(x) + 0.0341$. Đường cong thể hiện mối tương quan dương cao giữa nồng độ vi khuẩn *P.aeruginosa* (CFUs/mL) và tín hiệu OD₆₅₀

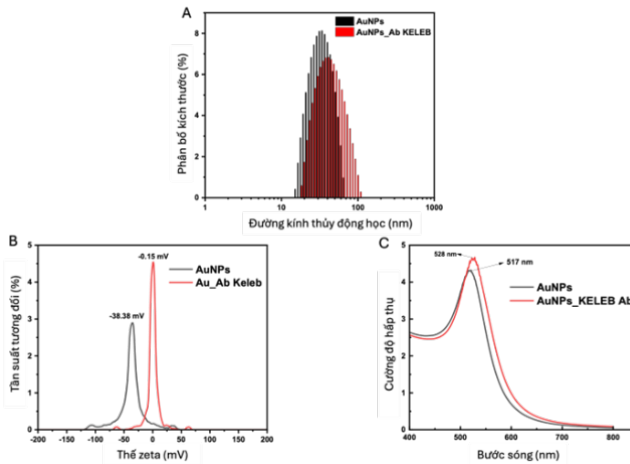
($R^2 = 0,9828$). LoD và LoQ được tính toán lần lượt là 26.795 và 88.423 CFU/mL.



Hình 3.9. Đường tuyến tính của vi khuẩn *P.aeruginosa* với nồng độ pha loãng nối tiếp từ 10^1 đến 10^9 CFU/mL. Dung dịch sau phản ứng có màu xanh gradient từ đậm tới nhạt tỉ lệ thuận với nồng độ của vi khuẩn trong Nano-ELISA.

3.5. Que thử nhanh LFIA phát hiện *Klebsiella pneumoniae*

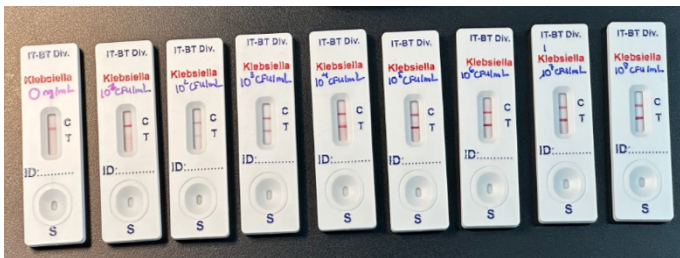
Trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng phương pháp liên kết cộng hóa trị nhằm gắn các nhóm chức lên bề mặt AuNPs thông qua phản ứng EDC/NHS. Sự dịch chuyển đỉnh từ phổ hấp thụ UV-Vis (**Hình 3.10C**) chứng tỏ quá trình chức năng hóa AuNPs bằng phối tử MUA đã liên kết hiệu quả với phân tử kháng thể Kleb Ab. Kết quả cho thấy thế zeta của AuNPs giảm từ $-38,38$ mV xuống $-0,15$ mV (**Hình 3.10B**), phản ánh sự suy giảm điện tích âm do sự gắn kết của các phân tử kháng thể mang điện tích dương. Đồng thời, kích thước hạt tăng lên sau quá trình cộng hợp cộng hóa trị (**Hình 3.10A**), xác nhận sự bao phủ của các phân tử kháng thể quanh bề mặt AuNPs.



Hình 3.10. (A) Kích thước thủy động học, (B) thế zeta, và (C) phổ hấp thụ UV–Vis trong khoảng bước sóng từ 400 đến 800 nm của hạt nano vàng (AuNPs) và phức hợp AuNPs–kháng thể *Klebsiella pneumoniae*.

Các que thử LFIA được chế tạo và đánh giá khả năng phát hiện *Klebsiella pneumoniae* trong dải nồng độ từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (**Hình 3.11**). Vạch phát hiện của *Klebsiella pneumoniae* có thể được quan sát rõ ở nồng độ 10^2 CFU/mL. Độ nhạy và khoảng hiệu chuẩn của que thử LFIA có tích hợp hệ thống phân tích độ bão hòa màu được đánh giá thông qua cường độ của vạch phát hiện trong khoảng nồng độ từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL.

(A)

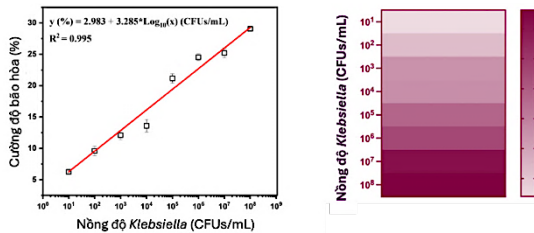


(B)



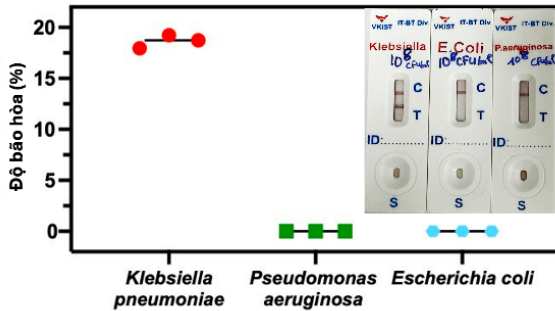
Hình 3.11. (A) Que thử LFIA được đánh giá khả năng phát hiện *K.pneumoniae* trong dải nồng độ từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (B) Các hình ảnh của que thử LFIA được chụp dưới điều kiện chiếu sáng với độ rọi 335 lux.

Các giá trị R, G và B trong mô hình RGB được sử dụng để xác định cường độ và độ bão hòa màu tại vạch thử (T-line) của LFIA. Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định là $y = 2,983 + 3,285 \log_{10}(x)$. Đường hồi quy thể hiện mối tương quan cao giữa nồng độ *Klebsiella pneumoniae* và tín hiệu bão hòa màu với $R^2 = 0,995$ (**Hình 3.12**). Giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) lần lượt được tính là 1,61 và 4,83 CFU/mL.



Hình 3.12. (A) Đường cong hiệu chuẩn và (B) bản đồ nhiệt dạng thang màu hồng của *Klebsiella pneumoniae* với dãy nồng độ pha loãng tuần tự từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL.

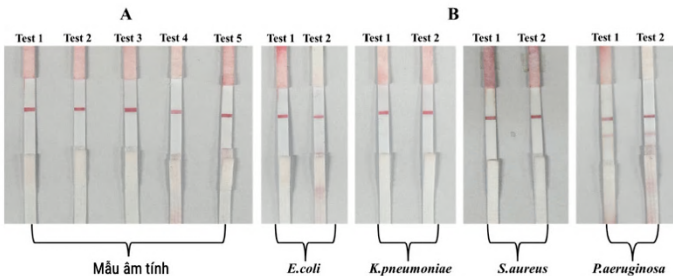
Kết quả thí nghiệm đánh giá tính đặc hiệu cho thấy không xuất hiện tín hiệu dương tính giả trên các que thử được kiểm tra với *E. coli* và *P. aeruginosa* khi quan sát bằng mắt thường (**Hình 3.12**), chứng minh rằng hệ thống LFIA định lượng được phát triển có tính đặc hiệu cao, khả năng kháng nhiễu tốt và có thể phát hiện chính xác *Klebsiella pneumoniae*.



Hình 3.12. Phân tích độ đặc hiệu của que thử phát hiện *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, và *P.aeruginosa* ở nồng độ 10^8 CFUs/mL.

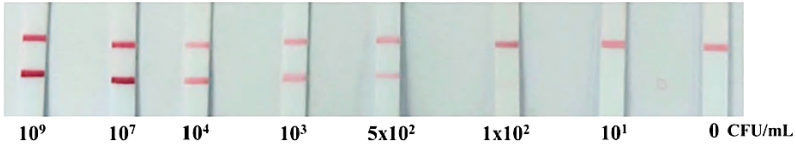
3.6. Que thử nhanh LFIA phát hiện *Pseudomonas aeruginosa*

Để đánh giá độ đặc hiệu của que thử LFIA, kết quả các mẫu đệm trắng và huyền phù vi khuẩn không mục tiêu (*E. coli*, *K. pneumoniae*, và *S. aureus*) chỉ xuất hiện duy nhất vạch C, không có tín hiệu tại vị trí vạch T (**Hình 3.14**).



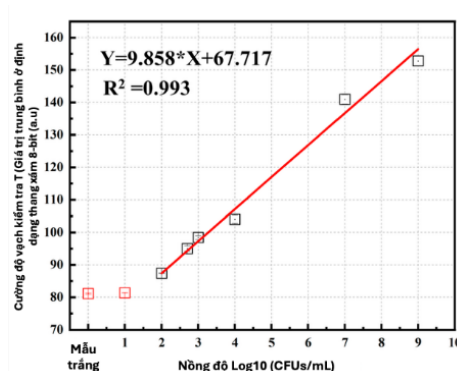
Hình 3.14. Đánh giá độ đặc hiệu sử dụng mẫu trắng, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, và *P. aeruginosa*.

Để xác định độ nhạy, ở các mẫu dương tính chứa *P. aeruginosa* trong khoảng từ 5×10^2 đến 10^9 CFU/mL, cả hai vạch kiểm soát (C) và vạch thử (T) đều xuất hiện, trong đó cường độ của vạch T thay đổi tùy theo nồng độ vi khuẩn (**Hình 3.15**).



Hình 3.15. Kết quả dải LFIA ở các nồng độ khác nhau của *P. aeruginosa*

Để tiến hành phân tích bán định lượng, hình ảnh của vùng thử (T) và vùng kiểm soát (C) trên que thử LFIA được xử lý bằng phần mềm ImageJ. Đường chuẩn thu được từ dải LFIA sử dụng các mẫu được pha trộn (spiked) với *P. aeruginosa* cho thấy mối quan hệ tuyến tính mạnh mẽ giữa cường độ vạch thử (y) và nồng độ vi khuẩn (x) trong khoảng từ 10^1 đến 10^9 CFU/mL, được mô tả bởi phương trình $y = 9,858x + 67,717$, với hệ số tương quan rất cao ($R^2 = 0.993$) (**Hình 3.16**).



Hình 3.16. Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa cường độ vạch thử (T-line) và nồng độ của *P. aeruginosa* trong mẫu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã sàng lọc được 15 aptamer tiềm năng đặc hiệu vi khuẩn *K.pneumoniae* và 6 aptamer tiềm năng đặc hiệu vi khuẩn *P.aeruginosa* sử dụng phương pháp SELEX. Từ đó, dựa trên các phương pháp phân tích mô phỏng đã lựa chọn được aptamer số 5 và aptamer T1 là các aptamer tiềm năng nhất đặc hiệu lần lượt đối với vi khuẩn *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa*.

2. Luận án đã phát triển hệ ELISA trực tiếp dựa trên cộng hợp thành công hạt nano vàng với kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal và việc tối ưu hóa thành công phương pháp nhuộm với sự có mặt của HAuCl_4 và $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ đã làm tăng độ nhạy phát hiện lên 100 lần, có thể phát hiện được vi khuẩn *K.pneumoniae* ở nồng độ thấp 10^2 CFU/mL.

3. Luận án đã phát triển hệ ELISA trực tiếp dựa trên cộng hợp thành công hạt nano vàng với aptamer T1 phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* ở nồng độ thấp 10^2 CFU/mL.

4. Luận án đã chế tạo que thử nhanh LFIA dựa trên việc cộng hợp thành công kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal lên bề mặt hạt nano vàng để sử dụng trực tiếp như kháng thể 2 trong việc chế tạo que thử LFIA phát hiện *K.pneumoniae* ở nồng độ 10 CFU/mL và không phản ứng chéo với các vi khuẩn *E.coli*, *S.typhimurium*, *C.perfringens*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*.

5. Luận án đã chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện *P.aeruginosa* dựa trên hấp phụ thành công aptamer T1 lên bề mặt hạt nano vàng tương tự như kháng thể 2 đặc hiệu. Que thử có giới hạn phát hiện *P.aeruginosa* thực nghiệm thấp ở nồng độ $2,34 \times 10^2$ CFU/mL và không phản ứng chéo với các vi khuẩn *E.coli*, *S.typhimurium*, *C.perfringens*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*.

KIẾN NGHỊ

Kết quả của luận án đã cho thấy tiềm năng ứng dụng của các kháng thể và aptamer đặc hiệu trong phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae* thông qua kỹ thuật sắc ký miễn dịch và ELISA trực tiếp. Tuy nhiên, để tăng cường giá trị ứng dụng thực tiễn và khả năng triển khai trong chẩn đoán lâm sàng, luận án kiến nghị cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu theo các hướng sau:

- Mở rộng số lượng mẫu nghiên cứu với quy mô lớn hơn và đa dạng hơn về nguồn gốc bệnh phẩm để đánh giá toàn diện độ đặc hiệu của các aptamer đã sàng lọc, đồng thời xác định khả năng phản ứng chéo với các loài thuộc cùng chi *Klebsiella*, *Pseudomonas* hay vi sinh vật khác thường gặp trong nhiễm khuẩn bệnh viện.
- Tiến hành thử nghiệm hệ thống phát hiện trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng thực tế có tải lượng vi khuẩn khác nhau nhằm đánh giá khả năng phát hiện và tính ứng dụng của phương pháp trong điều kiện nền mẫu phức tạp, đặc biệt đối với các mẫu có tải lượng vi khuẩn thấp, thường gặp ở giai đoạn sớm của quá trình nhiễm khuẩn.
- Tiếp tục tối ưu hóa điều kiện phản ứng và quy trình chế tạo que thử sắc ký miễn dịch và ELISA trực tiếp nhằm nâng cao độ ổn định và khả năng bảo quản của hệ thống phát hiện.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Luận án đã phát triển được quy trình sàng lọc hiệu quả các aptamer đặc hiệu cho hai loại vi khuẩn thường gây nhiễm trùng bệnh viện nghiêm trọng là *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*.
- Luận án đã chứng minh được tính hiệu quả của việc sử dụng aptamer cộng hợp hạt vàng như kháng thể hai đặc hiệu trên que thử miễn dịch nhanh và kỹ thuật ELISA trực tiếp.
- Luận án cho thấy tiềm năng ứng dụng của việc kết hợp đa dạng các thành phần nhận diện sinh học như aptamer và kháng thể cùng với vật liệu nano vàng trong việc xây dựng các nền tảng chẩn đoán tích hợp như kỹ thuật sắc ký miễn dịch dòng chảy bên (LFIA) và Nano-ELISA, góp phần nâng cao khả năng sàng lọc nhanh với độ nhạy cao đối với các vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*.