

BỘ GIÁO DỤC VÀ 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 MIỄN DỊCH VÀ
ELISA TRỰC TIẾP NHẪM PHÁT HIỆN *Pseudomonas*
aeruginosa VÀ *Klebsiella pneumoniae***

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ 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 MIỄN DỊCH VÀ
ELISA TRỰC TIẾP NHẪM PHÁT HIỆN *Pseudomonas*
aeruginosa VÀ *Klebsiella pneumoniae*

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Hóa sinh học

Mã số : 9 42 01 16

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công
nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS.
Trương Thị Ngọc Liên

GS.TS.
Trần Đại Lâm

Hà Nội – Năm 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan 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***” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn là PGS.TS.Trương Thị Ngọc Liên và GS.TS.Trần Đại Lâm. 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 2026

Tác giả luận án



Phạm Thu Thảo

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, với lòng chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến cô PGS.TS.Trương Thị Ngọc Liên, thầy GS.TS.Trần Đại Lâm đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện tốt nhất trong quá trình học tập, nghiên cứu để tôi hoàn thành luận án của mình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học vật liệu (trước là Viện Kỹ thuật nhiệt đới), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam-Hàn Quốc đã tạo điều kiện thuận lợi, nhiệt tình giúp đỡ trong suốt quá trình làm nghiên cứu sinh.

Tôi xin chân thành cảm ơn các anh chị và bạn bè đồng nghiệp tại Phòng Công nghệ tích hợp - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam-Hàn Quốc, Phòng Phân tích Thức ăn và Sản phẩm chăn nuôi - Viện Chăn nuôi và Thú y Việt Nam đã hết lòng giúp đỡ và chia sẻ với tôi trong thời gian làm luận án.

Tôi xin cảm ơn kinh phí hỗ trợ từ Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, tập đoàn Vingroup, trong khuôn khổ Chương trình tài trợ Dự án Khoa học và Công nghệ của Quỹ Đổi mới Sáng tạo Vingroup (VINIF) – mã số đề tài VINIF.2022.DA00032.

Cuối cùng tôi xin dành lời cảm ơn đến gia đình và người thân đã luôn bên cạnh động viên, hỗ trợ và khích lệ tinh thần tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện các nội dung của luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Tác giả luận án



Phạm Thu Thảo

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	1
LỜI CẢM ƠN	2
MỤC LỤC	3
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	5
DANH MỤC BẢNG	6
DANH MỤC HÌNH	7
MỞ ĐẦU	11
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	14
1.1. Nhiễm khuẩn bệnh viện và hai tác nhân mục tiêu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> và <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
1.2. Các phương pháp phát hiện và định lượng vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i> và <i>K.pneumoniae</i>	20
1.3. Aptamer: đặc điểm, phương pháp sàng lọc và ứng dụng trong phát hiện vi khuẩn.....	24
1.4. Nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch LFIA và ELISA trực tiếp.....	35
1.5. Phương pháp kết hợp aptamer - kháng thể và ứng dụng hạt nano vàng trong thiết kế cảm biến sinh học	40
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP.....	44
2.1. Đối tượng nghiên cứu, nguyên liệu, hóa chất và thiết bị	44
2.1.1. Địa điểm, thời gian nghiên cứu	44
2.1.2. Vật liệu	45
2.1.3. Thiết bị sử dụng.....	47
2.2. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho trực khuẩn <i>K.pneumoniae</i>	48
2.2.1. Quá trình chọn lọc SELEX.....	48
2.2.2. Xác định các trình tự aptamer tiềm năng	50
2.2.3. Mô phỏng ghép nối phân tử và mô phỏng động lực học phân tử.....	52
2.2.4. Khảo sát tính chất và các kỹ thuật phân tích	53
2.3. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho trực khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	55
2.4. Tổng hợp, chức năng hóa, phân tích đặc trưng hạt nano vàng AuNPs	56
2.4.1. Cộng hợp hạt nano vàng và kháng thể Rabbit anti- <i>K.pneumoniae</i> polyclonal bằng liên kết cộng hóa trị	56
2.4.2. Cộng hợp hạt nano vàng thụ động với aptamer và cộng hóa trị với kháng thể Goat anti-Mouse IgG	57
2.5. Phát triển hệ nano-ELISA một bước.....	58
2.5.1. Tối ưu hóa các thành phần tham gia hệ nano-ELISA	59

2.5.2. Quy trình tăng cường nhuộm và thử nghiệm Nano-ELISA phát hiện <i>K.pneumoniae</i>	61
2.5.3. Thử nghiệm Nano-ELISA phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	61
2.5.4. Xác định độ nhạy, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ), độ đặc hiệu của phương pháp.....	61
2.6. Thiết kế và chế tạo hệ sắc ký miễn dịch LFIA.....	62
2.6.1. Tối ưu dung dịch đệm chạy que thử.....	62
2.6.2. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện <i>K.pneumoniae</i>	63
2.6.3. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	65
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	70
3.1. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho <i>K.pneumoniae</i> và <i>P.aeruginosa</i>	70
3.1.1. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho <i>K.pneumoniae</i>	70
3.1.2. Chọn lọc aptamer cho trực khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	93
3.2. Khảo sát tính chất của hạt nano vàng	97
3.3. Phát triển kỹ thuật ELISA trực tiếp phát hiện <i>K.pneumoniae</i> và <i>P.aeruginosa</i>	98
3.3.1. Các điều kiện tối ưu của hoạt động nanozyme.....	98
3.3.2. Quá trình tối ưu hóa việc tăng cường nhuộm màu	100
3.3.3. Quá trình tối ưu hóa các điều kiện của Nano-ELISA.....	102
3.3.4. Phân tích độ đặc hiệu của Nano-ELISA với phương pháp nhuộm tăng cường phát hiện <i>K.pneumoniae</i>	104
3.3.5. Xác định ngưỡng, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) của Nano-ELISA có tăng cường nhuộm phát hiện <i>K.pneumoniae</i>	104
3.3.6. Phân tích độ đặc hiệu của Nano-ELISA với phương pháp nhuộm tăng cường phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	107
3.3.7. Xác định ngưỡng, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) của Nano-ELISA phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	108
3.4. Phát triển que thử nhanh LFIA phát hiện <i>K.pneumoniae</i> và <i>P.aeruginosa</i>	110
3.4.1. Kết quả tối ưu hóa dung dịch đệm chạy que thử.....	110
3.4.2. Que thử nhanh phát hiện <i>K.pneumoniae</i>	113
3.4.3. Que thử test nhanh LFIA phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	122
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	133
KẾT LUẬN	133
KIẾN NGHỊ.....	133
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ..	135
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	136
PHỤ LỤC	150

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AMR	Antimicrobial Resistance	Kháng kháng sinh
AuNPs	Gold nanoparticles	Hạt nano vàng
C line	Control line	Vạch đối chứng
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	Phổ trở kháng điện hóa
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
ELONA	Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay	Phép thử oligonucleotide gắn enzyme
FAM	Fluorescein amidites	Chất phát huỳnh quang
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Fluorescein isothiocyanat
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	Hidro perôxit
HAIs	Healthcare-Associated Infections	Nhiễm khuẩn bệnh viện
HRP	Horseradish peroxidase	Peroxidaza cải ngựa
K _d	Dissociation constant	Hằng số phân ly
LFIA	Lateral flow immunoassay	Xét nghiệm miễn dịch dòng chảy bên
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantification	Giới hạn định lượng
MFE	Minimum Free Energy	Năng lượng tự do tối thiểu
MIP	Molecularly imprinted polymer	Polyme in dấu phân tử
MUA	11-Mercaptoundecanoic acid	11- axit mercaptoundecanoic
OSA	O-specific antigen	kháng nguyên O
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
POCT	Point-of-Care Testing	Xét nghiệm tại chỗ
QD	Quantum dot	Chấm lượng tử
RT	Room temperature	Nhiệt độ phòng
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment	Sự tiến hóa của các phối tử bằng phương pháp làm giàu theo cấp số nhân
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering	Tán xạ Raman tăng cường bề mặt
T line	Test line	Vạch thử nghiệm
T _m	Melting temperature	Nhiệt độ nóng chảy
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Đặc điểm, ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp SELEX	26
Bảng 2.1. Các loài vi khuẩn được sử dụng trong luận án	45
Bảng 2.2. Các loại kháng nguyên, kháng thể được sử dụng trong luận án.....	45
Bảng 2.3. Các loại trình tự, môi trường được sử dụng trong luận án.....	46
Bảng 2.4. Các thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu.....	47
Bảng 2.5. Các thành phần trong phản ứng PCR cho vòng chọn lọc.....	49
Bảng 2.6. Các thành phần trong phản ứng PCR bất đối xứng	50
Bảng 3.1. Tóm tắt các điều kiện tối ưu hóa phản ứng PCR đối xứng trong hai vòng SELEX đầu tiên.....	71
Bảng 3.2. Tóm tắt các điều kiện tối ưu hóa phản ứng PCR bất đối xứng.....	73
Bảng 3.3. Các thông số SELEX chọn lọc aptamer đặc hiệu LPS của <i>K.pneumoniae</i>	75
Bảng 3.4. Danh sách các trình tự aptamer được lựa chọn để thực hiện nghiên cứu mô phỏng trong đề tài này. Các đoạn in đậm biểu thị vùng môi trường được sử dụng cho phản ứng PCR, trong khi các đoạn còn lại là vùng biến đổi của các aptamer.	77
Bảng 3.5. Năng lượng docking của 15 aptamer với phân tử LPS. Đối với mỗi hệ thống, giá trị năng lượng docking thấp nhất được trình bày.	79
Bảng 3.6. 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.	80
Bảng 3.7. Đặc tính của sáu 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.	95
Bảng 3.8. So sánh phương pháp nghiên cứu với các phương pháp phát hiện viêm phổi do <i>Klebsiella</i> khác	107
Bảng 3.9. Các giá trị R, G, và B trong mô hình RGB xác định cường độ và độ bão hòa của màu sắc tại vạch thử (T-line) của que thử LFIA.....	118
Bảng 3.10. So sánh phương pháp nghiên cứu trong công trình này với các phương pháp phát hiện <i>K.pneumoniae</i> khác.....	121
Bảng 3.11. Giá trị cường độ màu của vạch thử (T-line) đối với các mẫu trắng	129
Bảng 3.12. Giá trị cường độ màu của vạch thử (T-line) đối với các nồng độ khác nhau của mẫu <i>P.aeruginosa</i>	129
Bảng 3.13. So sánh các phương pháp LFIA đã được báo cáo cho phát hiện <i>Pseudomonas</i> với hệ thống LFIA lai trong nghiên cứu này.....	130

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học giản lược của lipopolysaccharide (LPS) ở <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (kiểu huyết thanh O5).....	16
Hình 1.2. Vai trò của LPS trong độc lực của <i>K. pneumoniae</i>	17
Hình 1.3. Các yếu tố độc lực của <i>K. pneumoniae</i>	18
Hình 1.4. Quy trình SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential ... Enrichment).....	26
Hình 1.5. Các loại cảm biến sinh học dựa trên aptamer phát hiện vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	28
Hình 1.6. Mô hình aptamer gắn nhãn huỳnh quang với QD và FITC (A) liên hợp của QD và aptamer không chứa spacer (B) chứa spacer (C) FITC-gắn nhãn aptamer... ..	29
Hình 1.7. Mô hình (a) aptamer&FAM-cDNA@MNPs (b) phương pháp phát hiện <i>P.aeruginosa</i>	30
Hình 1.8. Nguyên lí của que thử phát hiện đồng thời một số chỉ dấu DNA và protein phát hiện vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	31
Hình 1.9. Nguyên lý hoạt động của cảm biến dựa trên công nghệ MIP với sự chuẩn bị polymer-GO trên điện cực vàng nhằm phát hiện <i>K. pneumoniae</i>	32
Hình 1.10. Các thành phần của que thử nhằm phát hiện K1 và K2 của vi khuẩn <i>K. pneumoniae</i>	33
Hình 1.11. Sơ đồ minh họa nền tảng cảm biến dựa trên aptamer và vật liệu khung cơ kim có độ nhạy siêu cao trong phát hiện lâm sàng <i>K.pneumoniae</i> mang gen KPC-2	34
Hình 1.12. (A) Cấu tạo nguyên lý của que thử nhanh LFIA thông thường; (B) Cấu tạo nguyên lý của định dạng sandwich và định dạng cạnh tranh phổ biến của LFIA.....	38
Hình 1.13. Ứng dụng nanozyme trong ELISA thay thế enzyme HRP	39
Hình 1.14. Cấu tạo nguyên lý của kỹ thuật lai ELAAA và LFS.....	43
Hình 2.1. Sơ đồ tổng quan nghiên cứu của luận án	44
Hình 2.2. Quy trình chọn lọc aptamer cho kháng nguyên LPS <i>K.pneumoniae</i>	51
Hình 2.3. Quy trình thử nghiệm nano-ELISA phát hiện vi khuẩn <i>K.pneumoniae</i> ..	59
Hình 2.4. Quy trình thử nghiệm nano-ELISA phát hiện vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	59
Hình 2.5. Nguyên lý của que thử nhanh sử dụng kháng thể phát hiện vi khuẩn <i>K.pneumoniae</i>	64
Hình 2.6. Nguyên lý của que thử nhanh sử dụng aptamer đặc hiệu phát hiện vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i>	68
Hình 3.1. Ảnh điện di gel agarose 2% đánh giá các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR đối xứng trong vòng thứ nhất và thứ hai.....	72

Hình 3.2. Ảnh điện di gel agarose 4% đánh giá các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR bất đối xứng.	74
Hình 3.3. Quá trình làm giàu thư viện aptamer đặc hiệu với LPS từ <i>K.pneumoniae</i> trong SELEX.	76
Hình 3.4. Sơ đồ minh họa quy trình liên kết trong phép đo SERS.....	82
Hình 3.5. Phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) của các aptamer (A) No.5, (B) No.7, (C). No.9 được lựa chọn trước và sau khi tương tác với LPS từ <i>K.pneumoniae</i>	84
Hình 3.6. (A) Sơ đồ cơ chế của phép đo phổ trở kháng điện hóa. (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 <i>K.pneumoniae</i>	87
Hình 3.7. Tính chọn lọc của các điện cực AuNPs/SPCE được cố định aptamer No.5 (A) và No.7 (B) đối với các chất phân tích khác nhau. (C) Hằng số phân ly (K_d) của aptamer No.5.	89
Hình 3.8. Biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ ssDNA qua các vòng SELEX toàn tế bào đối với <i>P. aeruginosa</i>	93
Hình 3.9. Mô hình tương tác docking giữa aptamer T1 và kháng nguyên CPA (thuộc LPS) trên bề mặt <i>P. aeruginosa</i>	96
Hình 3.10. Hình ảnh TEM với thang đo 50 nm, 100 nm (a) và phổ UV-Vis trong phạm vi bước sóng từ 400 đến 800 nm của hạt AuNP (b).	98
Hình 3.11. Các phép đo tán xạ ánh sáng động (DLS) cho đường kính thủy động của các hạt nano vàng (a) Điện thế Zeta của các hạt nano vàng (b).	98
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ TMB (a, b) và H_2O_2 (c, d) lên hoạt tính của nanozyme trong 30 phút (a, c) và trong vòng 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm (b, d).	99
Hình 3.13. Đánh giá hoạt tính nanozyme khi có mặt TMB và H_2O_2 , đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm..	100
Hình 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ $HAuCl_4$ (a) và $NH_2OH.HCl$ (b) lên khả năng tăng cường nhuộm màu được đo bằng độ hấp thụ tín hiệu ở 650 nm.	101
Hình 3.15. 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.	101
Hình 3.16. Ảnh hưởng của nồng độ kháng thể Rabbit anti- <i>K.pneumoniae</i> polyclonal lên hoạt tính nanozyme trong 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm.	103

Hình 3.17. Ảnh hưởng của nồng độ aptamer đặc hiệu cho <i>P.aeruginosa</i> lên hoạt tính nanozyme trong 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm.....	103
Hình 3.18. Phân tích độ đặc hiệu của Nano-ELISA đối với các tác nhân gây bệnh phổ biến ở nồng độ 10^8 CFU/mL , bao gồm <i>P.aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> và <i>K.pneumoniae</i>	104
Hình 3.19. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp nano-ELISA.	105
Hình 3.20. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu..	105
Hình 3.21. Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>K.pneumoniae</i> 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 <i>K.pneumoniae</i> từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (b) trong Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu.	106
Hình 3.22. Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>K.pneumoniae</i> 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 <i>K.pneumoniae</i> từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (b) trong Nano-ELISA.	106
Hình 3.23. Phân tích độ đặc hiệu của Nano-ELISA đối với các tác nhân gây bệnh phổ biến ở nồng độ 10^9 CFU/mL, bao gồm <i>P.aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> và <i>K.pneumoniae</i>	108
Hình 3.24. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp Nano-ELISA phát hiện <i>P.aeruginosa</i> . Giá trị ngưỡng được thiết lập bằng tổng của giá trị trung bình và ba lần độ lệch chuẩn.....	109
Hình 3.25. Đường tuyến tính của vi khuẩn <i>P.aeruginosa</i> với nồng độ pha loãng nối tiếp từ 10^1 đến 10^9 CFU/mL..	109
Hình 3.26. Thế zeta của hạt nano vàng phân tán trong các dung dịch đệm khác nhau.	111
Hình 3.27. Phổ hấp thụ UV-Vis của hạt nano vàng phân tán trong các dung dịch đệm khác nhau.....	112
Hình 3.28. Ảnh hưởng của các hệ đệm và pH khác nhau đến tín hiệu của que thử LFIA	113
Hình 3.29. (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 Rabbit anti- <i>K.pneumoniae</i> polyclonal.....	114

- Hình 3.30.** Phổ SERS của các hạt nano vàng (AuNPs) sau từng bước biến đổi bề mặt, bao gồm: (b) biến đổi với MUA, (c) gắn kháng thể kháng Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal, và (d) tương tác với vi khuẩn *K.pneumoniae*. 116
- Hình 3.31.** Phân tích độ đặc hiệu của que thử phát hiện *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, và *P.aeruginosa* ở nồng độ 10^8 CFUs/mL 116
- Hình 3.32.** (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. 118
- Hình 3.33.** (A) Đường cong hiệu chuẩn và (B) bản đồ nhiệt dạng thang màu hồng của *K.pneumoniae* với dãy nồng độ pha loãng tuần tự từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL. ... 120
- Hình 3.34.** Hình ảnh gốc của các que thử LFIA với dãy pha loãng của vi khuẩn *K.pneumoniae* từ 10^8 đến 10^1 CFU/mL, được thực hiện với ba lần lặp lại và mười mẫu trắng. 120
- Hình 3.35.** (A) Màu sắc của các dung dịch AuNP được ủ với aptamer T1 (0,80 mg/mL) ở các mức nhiệt độ khác nhau trong 1 giờ, sau khi thêm 10% NaCl. (B) Phổ UV–Vis của các dung dịch trong (A) cho thấy mẫu ủ ở 60°C có cường độ hấp thụ cao nhất 122
- Hình 3.36.** Phổ hấp thụ UV–Vis của các phức hợp AuNP–aptamer T1 được chuẩn bị với các nồng độ aptamer đặc hiệu đối với *P. aeruginosa* khác nhau sau khi thêm NaCl 123
- Hình 3.37.** Màu sắc của các dung dịch: (A) AuNPs; (B) phức hợp AuNP–aptamer; (C) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với *P. aeruginosa*; (D, E) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với các vi khuẩn không đích (*K. pneumoniae* và *S. aureus*, tương ứng), trước (1) và sau (2) khi thêm NaCl. 125
- Hình 3.38.** Đánh giá độ đặc hiệu sử dụng mẫu trắng, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, và *P. aeruginosa*. (A) Hình ảnh các que thử sau khi kiểm tra với mẫu trắng (không chứa vi khuẩn); (B) Hình ảnh các que thử sau khi kiểm tra với các mẫu *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, và *P. aeruginosa*, mỗi mẫu có cùng nồng độ 10^3 CFU/mL. 126
- Hình 3.39.** Kết quả dải LFIA ở các nồng độ khác nhau của *P. aeruginosa* 127
- Hình 3.40.** Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa cường độ vạch thử (T-line) và nồng độ của *P. aeruginosa* trong mẫu..... 129

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’ (viết tắt của sáu vi khuẩn có độc lực cao và đa kháng *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Enterobacter spp.*), 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 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 oligonucleotide DNA hoặc RNA mạch đơn ngắn có khả năng nhận diện và liên kết đặc hiệu với phân tử đích thông qua cấu trúc không gian đặc thù – đã nổi lên như một công cụ sinh học tiềm năng, có thể thay thế hoặc bổ trợ cho kháng thể truyền thống trong phát hiện và chẩn đoán tác nhân gây bệnh. Nhờ các ưu điểm như độ bền nhiệt cao, khả năng biến đổi hóa học linh hoạt, dễ tổng hợp nhân tạo, chi phí sản xuất thấp và tính ổn định giữa các lô sản xuất, aptamer ngày càng được quan tâm ứng dụng trong phát triển các hệ thống cảm biến sinh học thế hệ mới. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về chọn lọc aptamer đặc hiệu đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* 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 dòng chảy bên hoặc ELISA trực tiếp kết hợp vật liệu nano nhằm nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu và rút ngắn thời gian phát hiện vẫn là một hướng nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Trong bối cảnh các vi khuẩn này là những tác nhân gây nhiễm khuẩn cơ hội quan trọng, có liên quan đến tình trạng nhiễm khuẩn bệnh viện và xu hướng kháng kháng sinh ngày càng gia tăng, việc phát triển các phương pháp phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu là hết sức cần thiết. 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 các thành phần nhận diện sinh học 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 *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella 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*.

Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài:

- Cung cấp nguồn nguyên liệu aptamer đặc hiệu mới, tạo tiền đề cho việc chế tạo các loại cảm biến sinh học có độ nhạy cao và định hướng ứng dụng trong y học nano tại Việt Nam.
- Kết quả nghiên cứu cung cấp cho các cơ sở y tế những công cụ xét nghiệm tiên tiến, giúp phát hiện nhanh các tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện, từ đó tối ưu hóa phác đồ điều trị.

Những đóng góp mới của đề tài:

- 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*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Sự chuyển dịch từ các phương pháp chẩn đoán dựa trên kiểu hình truyền thống sang các kỹ thuật cảm biến sinh học hiện đại đã mở ra kỷ nguyên mới trong giám sát vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là với các tác nhân đa kháng thuốc như *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae*. Trong xu thế đó, sự ra đời của aptamer, được ví như 'kháng thể hóa học' với các đặc tính ưu việt về độ bền và tính chọn lọc, đang trở thành nền tảng quan trọng để phát triển các phương pháp chẩn đoán mới.

Phần tổng quan của luận án sẽ tập trung hệ thống hóa đặc điểm sinh học, yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn mục tiêu trong mối liên hệ với gánh nặng nhiễm khuẩn bệnh viện hiện nay. Đồng thời, nội dung chương đi sâu phân tích cơ sở lý luận về kỹ thuật SELEX, các mô hình sử dụng aptamer-kháng thể và chiến lược tích hợp chúng vào hệ thống sắc ký miễn dịch (LFIA) cùng ELISA trực tiếp ứng dụng hạt nano vàng. Những phân tích này không chỉ làm rõ các bước tiến công nghệ trong chẩn đoán nhanh mà còn thiết lập nền tảng khoa học cho việc chọn lọc trình tự đặc hiệu và phát triển các hệ thống phát hiện vi khuẩn có độ nhạy cao của nghiên cứu.

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

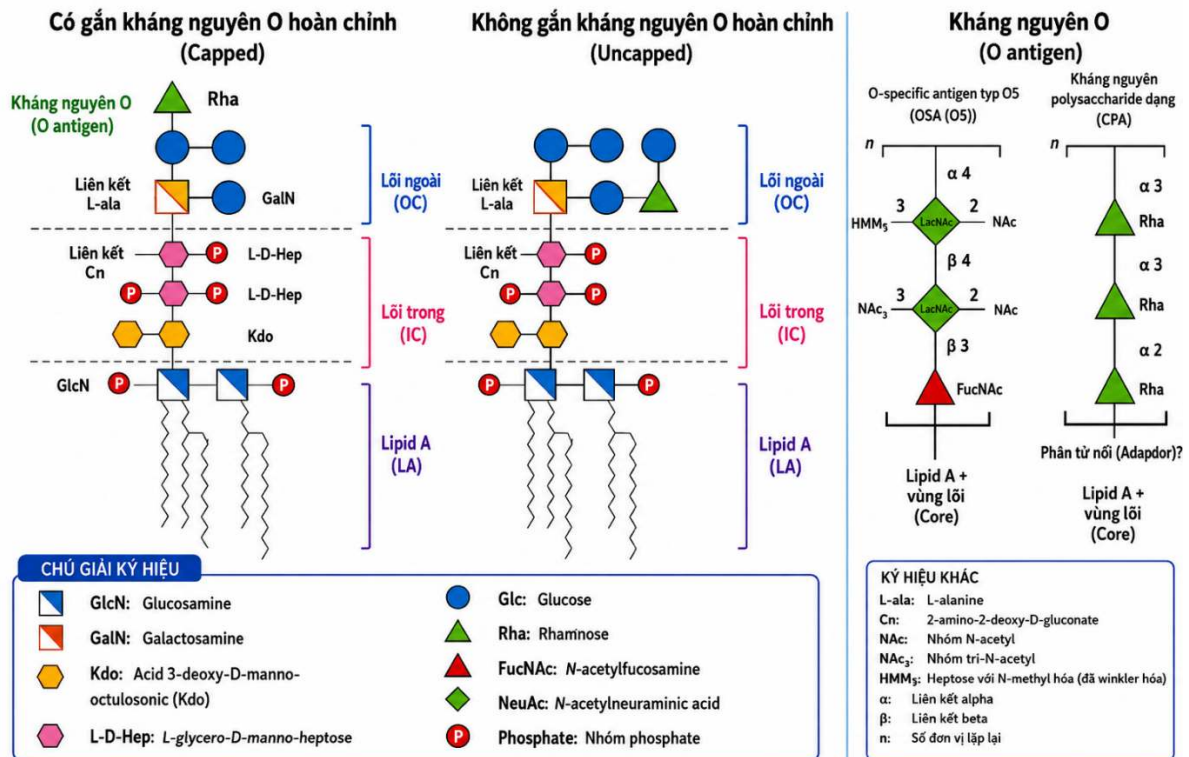
Nhiễm khuẩn bệnh viện (Hospital-Acquired Infections-HAIs) là một trong những nguyên nhân chính làm gia tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong ở người bệnh, đồng thời kéo dài thời gian nằm viện và điều trị tại khoa hồi sức (ICU), gây ra tổn thương tâm lý cũng như gánh nặng kinh tế đáng kể cho người bệnh và hệ thống y tế. Theo khảo sát đa trung tâm của Tổ chức Liên minh Kiểm soát Nhiễm khuẩn Quốc tế (INICC) thực hiện tại nhiều quốc gia đang phát triển, bao gồm cả Ấn Độ, tỷ lệ tử vong do nhiễm khuẩn bệnh viện dao động từ 35,2% đến 44,9% [1]. Gánh nặng tài chính do HAIs thường bị làm trầm trọng thêm bởi nhiều yếu tố như thời gian nằm viện kéo dài, sử dụng các loại kháng sinh và thuốc đắt tiền, tăng tần suất xét nghiệm cận lâm sàng, cùng với mất mát thu nhập do gián đoạn công việc. Tổng hợp các yếu tố này không chỉ gây áp lực lớn lên nguồn lực y tế mà còn tạo gánh nặng đáng kể cho người bệnh và gia đình, đặc biệt ở các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình, nơi hệ thống kiểm soát nhiễm khuẩn còn hạn chế. Nguyên nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện (HAIs) rất đa dạng, tùy thuộc vào môi trường cơ sở y tế, đặc điểm của nhóm bệnh nhân và điều kiện của từng quốc gia. Các vi khuẩn Gram dương thường gặp gây HAIs bao gồm *Staphylococcus aureus*, các chủng *Staphylococcus* âm tính với coagulase (Coagulase-negative *Staphylococci* – CoNS), và *Enterococcus* spp.. Trong khi đó, các vi khuẩn Gram âm thường liên quan đến nhiễm khuẩn bệnh viện là

Klebsiella pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli* [2].

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) là một loại vi khuẩn Gram âm hiếu khí, là tác nhân chủ yếu gây nên nhiễm trùng ở cộng đồng (community-acquired) và nhiễm trùng ở bệnh viện (hospital-acquired). Nhiều loại nhiễm trùng ở cộng đồng có thể kể đến như viêm loét giác mạc (thường liên quan đến việc sử dụng kính áp tròng), viêm tai ngoài (thường ở những người bị suy giảm miễn dịch như bệnh nhân đái tháo đường), và nhiễm trùng da và mô mềm. Đối với nhiễm trùng bệnh viện, bệnh nhân nhập viện có thể bị nhiễm *P. aeruginosa* khi nhập viện hoặc có thể nhiễm *P. aeruginosa* trong thời gian nằm viện và *P. aeruginosa* có thể được phân lập từ hầu hết mọi nguồn trong bệnh viện [3]. Trong một nghiên cứu trên nhiều ca nhiễm trùng vết mổ bệnh viện, *P. aeruginosa* được cho là nguyên nhân gây ra khoảng 6% trong tất cả các trường hợp. Trong dữ liệu được thu thập từ đơn vị điều trị tích cực (Intensive Care Unit – ICU), *P. aeruginosa* được báo cáo là nguyên nhân gây ra khoảng 16% các ca nhiễm trùng vết mổ và là nguyên nhân phổ biến nhất gây nhiễm trùng tại chỗ đối với các ca sau phẫu thuật đường tiêu hóa [4]. *P. aeruginosa* là nguyên nhân phổ biến gây nhiễm trùng đường tiết niệu bệnh viện, chiếm khoảng 9% trường hợp nhiễm trùng đường tiết niệu trên toàn bệnh viện và lên tới 16,3% trường hợp nhiễm trùng đường tiết niệu ở bệnh nhân ICU [5].

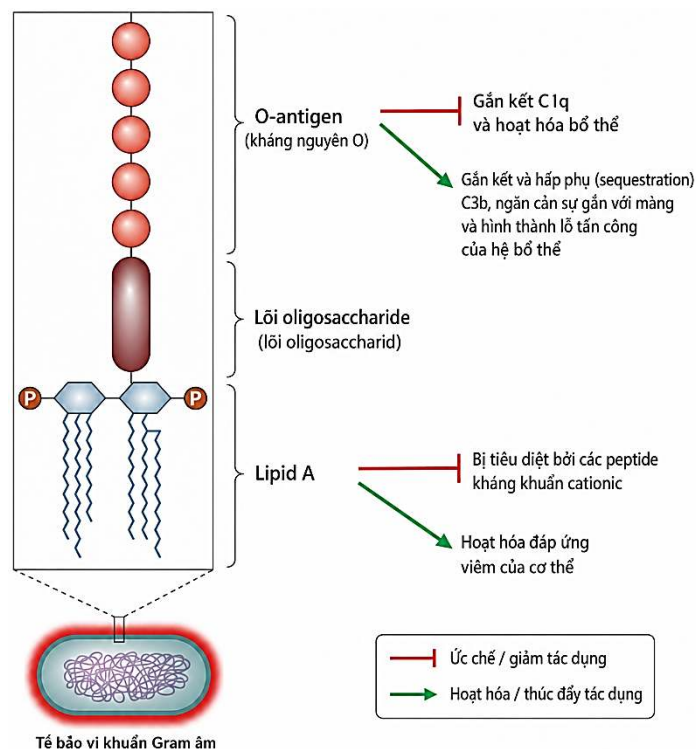
P. aeruginosa có khả năng thích nghi với môi trường bất lợi trong tế bào vật chủ bằng cách tiết ra một loạt các yếu tố độc lực, góp phần vào việc lây nhiễm thành công và gây bệnh cho tế bào vật chủ [6]. Lipopolysaccharide (LPS, nội độc tố) của vi khuẩn này đã được nghiên cứu rộng rãi trong nhiều lĩnh vực sinh học do đóng vai trò quan trọng trong độc lực của vi khuẩn. LPS bao gồm ba vùng cấu trúc riêng biệt: lipid A, lõi oligosaccharide và kháng nguyên O (còn gọi là O polysaccharide, hoặc O-antigen). Các vùng này vừa đảm nhiệm những chức năng riêng biệt, vừa có sự chồng lấp trong hoạt động sinh lý của vi khuẩn. Kháng nguyên O là thành phần polysaccharide dài của LPS, với chiều dài có thể thay đổi từ một đến hàng trăm đơn vị đường. Kháng nguyên O được tổng hợp riêng biệt với phức hợp lipid A–lõi (lipid A-core) và sau đó mới được gắn vào cấu trúc này. Do đó, không phải mọi phân tử lipid A–lõi đều được gắn kháng nguyên O trước khi được vận chuyển ra màng ngoài. Kết quả là bề mặt màng ngoài (outer membrane, OM) của vi khuẩn có tính không đồng nhất, bao gồm cả các phân tử LPS có và không có kháng nguyên O (**Hình 1.1**). Polymer kháng nguyên O được cấu tạo từ các đơn vị đường lặp lại, có tính biến đổi cấu trúc rất cao giữa các loài cũng như giữa các chủng trong cùng một loài [7]. Tính không đồng nhất trong cấu trúc kháng nguyên O là kết quả của sự khác biệt về thành

phần các loại đường trong đơn vị lặp lại, kiểu liên kết glycoside giữa các đơn vị đường, sự có mặt hoặc không có mặt của các mạch nhánh, cũng như các biến đổi không theo tỷ lệ cố định. *P. aeruginosa* có khả năng đồng thời tổng hợp hai loại kháng nguyên O, bao gồm kháng nguyên polysaccharide chung (common polysaccharide antigen – CPA) và kháng nguyên đặc hiệu O (O-specific antigen – OSA) [8]. CPA có cấu trúc bảo tồn chung, gồm các đơn vị lặp lại $\rightarrow 3) \text{d-Rha}(\alpha 1 \rightarrow 3) \text{d-Rha}(\alpha 1 \rightarrow 2) \text{d-Rha}(\alpha 1 \rightarrow$, trong khi cấu trúc của OSA có tính biến đổi cao. Chính sự đa dạng này là cơ sở để phân type huyết thanh, giúp phân chia loài vi khuẩn này thành nhiều nhóm huyết thanh khác nhau [9]. Các nghiên cứu dịch tễ cho thấy sự phân bố các serotype không đồng nhất giữa các quần thể nghiên cứu, nhưng O6, O11 và O1 thường nằm trong nhóm phổ biến nhất. Trong một nghiên cứu đa quốc gia trên 413 chủng *P. aeruginosa* xâm lấn, O11 chiếm 22%, O1 chiếm 14% và O6 chiếm 13%; ba serotype này chiếm gần một nửa số chủng được khảo sát [10]. Một nghiên cứu trên bệnh nhân viêm phổi bệnh viện cũng ghi nhận O6 và O11 là hai serotype phổ biến nhất, lần lượt chiếm 29,3% và 22,8% [11]. Tuy nhiên, phân bố serotype có thể thay đổi đáng kể theo địa lý, bệnh cảnh lâm sàng và nhóm bệnh nhân; do đó, không nên xem một serotype là đại diện tuyệt đối cho toàn bộ quần thể *P. aeruginosa*.



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học giản lược của lipopolysaccharide (LPS) ở *P. aeruginosa* PAO1 (kiểu huyết thanh O5) [9]

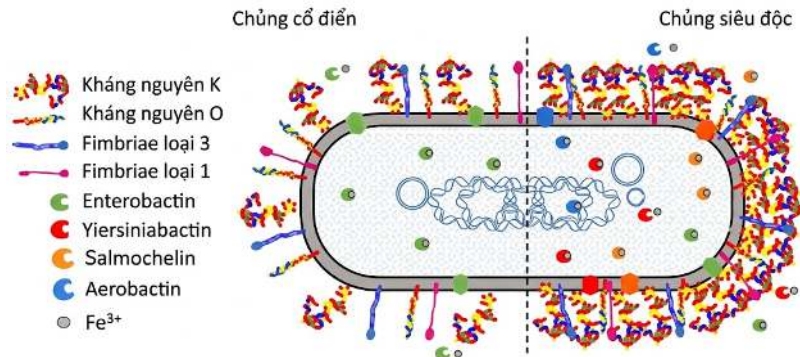
Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) là vi khuẩn gram âm, không di động thuộc họ Enterobacteriaceae có vỏ polysaccharide, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế gây nhiễm và khả năng ngăn chặn quá trình thực bào [12]. Vi khuẩn này là mầm bệnh cơ hội và là một trong những nguyên nhân phổ biến nhất gây nhiễm trùng bệnh viện từ viêm phổi, viêm màng não, áp xe gan, nhiễm trùng đường tiết niệu (UTI), nhiễm trùng vết thương, đến nhiễm khuẩn huyết và nhiễm trùng huyết [13]. Ở *K. pneumoniae*, LPS có cấu trúc gồm ba thành phần cơ bản: lipid A, core oligosaccharide và O-antigen polysaccharide (OPS). Core oligosaccharide nằm giữa lipid A và O-antigen, tạo cầu nối cấu trúc giữa phần lipid và chuỗi polysaccharide phía ngoài. Ở *K. pneumoniae* đã xác định hai kiểu core oligosaccharide chính là type 1 và type 2. Phần inner core gần lipid A có tính bảo tồn tương đối cao do chịu những ràng buộc về chức năng duy trì tính toàn vẹn của màng ngoài, trong khi outer core có mức độ khác biệt cao hơn và là vị trí gắn O-antigen. Do nằm ở phía ngoài của LPS, O-antigen có khả năng tiếp xúc trực tiếp với môi trường và hệ miễn dịch vật chủ, đồng thời góp phần tạo nên sự khác biệt về tính kháng nguyên giữa các chủng [14].



Hình 1.2. Vai trò của LPS trong độc lực của *K. pneumoniae* [15]

Tác nhân gây bệnh của *K. pneumoniae* có liên quan đến sự hiện diện của một số gen độc lực mã hóa các yếu tố độc lực và cho phép nó tấn công hệ thống miễn dịch của vật chủ và dẫn đến nhiều loại bệnh: biểu hiện kháng nguyên O lipopolysaccharide (LPS) và vỏ polysaccharide (kháng nguyên K) (được mã hóa bởi các locus K và O

khác nhau), siderophore enterobactin (ent locus), và fimbriae loại I và loại III (fim và mrk locus) [16]. Vỏ capsule là một ma trận polysaccharide ngoại bào bao bọc quanh vi khuẩn và được sản xuất quá mức ở các chủng *K. pneumoniae* siêu độc (hypervirulent *K. pneumoniae* - Hv-Kp). LPS là một phần không thể thiếu của màng ngoài và được sản xuất bởi cả chủng thường và Hv-Kp. Các fimbriae loại I và loại III là các cấu trúc kết dính có màng, tạo điều kiện thuận lợi cho việc gắn và bám và các tế bào vật chủ, đồng thời tham gia tương tác với đại thực bào, hình thành biofilm [17]. Các yếu tố độc lực của *K. pneumoniae* đã được mô tả chi tiết như trong **Hình 1.3**. Có thể phân loại *K. pneumoniae* theo nhiều hệ thống khác nhau. Về kiểu huyết thanh bề mặt, hai hệ thống quan trọng nhất là K-antigen, tương ứng với polysaccharide của capsule, và O-antigen, tương ứng với polysaccharide của LPS. Trong khi hệ thống K-antigen có số lượng và mức độ đa dạng rất lớn, số lượng O-antigen của *K. pneumoniae* ít hơn đáng kể. Bốn type O1, O2, O3 và O5 đã được chứng minh chiếm khoảng 90,1% trong một bộ sưu tập gồm 645 chủng xâm lấn đa quốc gia. O1 đặc biệt đáng chú ý vì có liên quan với các chủng đa kháng thuốc [18]. Đối với *K. pneumoniae*, cấu trúc LPS gồm lipid A–core–O-antigen, trong đó O-antigen là vùng đa dạng nhất nhưng số lượng type tương đối hạn chế so với K-antigen, làm cho O-antigen trở thành một đích tiềm năng để phát triển aptamer.



Hình 1.3. Các yếu tố độc lực của *K. pneumoniae* [17]

Một nghiên cứu giám sát đa trung tâm gần đây trên 1.000 chủng vi khuẩn gây nhiễm trùng đường hô hấp dưới tại sáu bệnh viện ở Việt Nam đã sử dụng VITEK-2/Phoenix M50 để định danh, kết hợp E-test hoặc vi pha loãng để xác định MIC và PCR đa môi để phát hiện các gen kháng thuốc. Kết quả cho thấy sự xuất hiện của *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae* lần lượt là 21,0 % và 18,6%. Hai loài này thuộc nhóm các tác nhân Gram âm quan trọng nhất được phân lập từ nhiễm trùng đường hô hấp dưới tại các bệnh viện Việt Nam [19]. Kháng thuốc đã trở thành một thảm họa toàn cầu, đe dọa sức khỏe cộng đồng. Việc sử dụng kháng sinh phổ rộng quá mức và không đúng cách trong những năm gần đây đã làm gia tăng đáng kể tình trạng kháng thuốc

ở *K. pneumoniae*. Sau các chủng *K. pneumoniae* sản xuất β -lactamase phổ rộng, các phân lập *K. pneumoniae* kháng carbapenem (CRKP) xuất hiện trở thành mối quan ngại lớn về sức khỏe cộng đồng toàn cầu có liên quan đến tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao. Tỷ lệ tử vong gộp liên quan đến nhiễm trùng CRKP được ước tính dao động từ 37,2% (95% CI, 33,1%–41,4%) đến 42,1% (95% CI, 37,1%–47,3%) [20]. Kháng carbapenem ở *A. baumannii*, *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae* lần lượt là 69,1%, 44,4% và 2,9% tại Việt Nam. Gần 85% bệnh nhân ICU được sử dụng kháng sinh, kháng sinh beta-lactam phổ rộng (cephalosporin thế hệ 3, 4 và carbapenem) và fluoroquinolone lần lượt chiếm 39,7% và 19,4% tổng lượng kháng sinh được sử dụng tại các ICU Việt Nam. Các nghiên cứu cho thấy một số trình tự nguy cơ cao của *P. aeruginosa* có mối tương quan chặt chẽ với các O-serotype đặc hiệu. Trong đó, ST235 thường liên quan serotype O11, ST111 liên quan O12, ST132 liên quan O6 và ST244 liên quan O5. Serotype O11 được xem là kiểu huyết thanh ưu thế ở các chủng đa kháng thuốc (MDR/XDR) và thường xuất hiện ở các dòng nguy cơ cao lưu hành toàn cầu như ST235, ST308 và ST357 [21]. Tại Việt Nam, hai mươi chủng *P. aeruginosa* kháng carbapenem (CRPA) đã được phân lập từ mẫu ngoáy trực tràng của các bệnh nhân nhập khoa hồi sức tích cực (ICU). Kết quả kiểu trình tự đa locus (multilocus sequence type – MLST) chiếm ưu thế là ST308, chiếm 50% (10/20) số chủng phân lập. Đáng chú ý, 70% (14/20) các chủng CRPA mang gene mã hóa metallo- β -lactamase (MBL), trong đó *blaNDM-1* là gene phổ biến nhất với tỷ lệ 86% (12/14), tiếp theo là *blaIMP-26* chiếm 14% (2/14) [22]. Vo và cộng sự nghiên cứu 224 chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Nhân dân Gia Định trong năm 2019. Vi khuẩn được phân lập chủ yếu từ các trường hợp viêm phổi và nhiễm trùng da, mô mềm. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ MDR và XDR lần lượt là 7,1% và 20,5% [23]. Đối với *K. pneumoniae*, nghiên cứu kiểu gen đa kháng thuốc đã thu thập được 68 STs với sự nổi trội của ST15 (34%) và ST16 (30%); các gen kháng thuốc gặp phổ biến là *blaNDM* (54,45%), *blaOXA* (46,51%), *blaKPC* (45,07%), *blaCTX* (51,80%), *blaSHV* (98,44%), *blaTEM* (52,16%) [24]. Các dòng nguy cơ cao của *K. pneumoniae* như ST11-KL64, ST15-KL112 và ST16-KL51 thường liên quan đến các O-type đặc hiệu như O1v1/O4, O3/O3a, O2v1 [25]. Kết quả từ Mạng lưới Giám sát Kháng thuốc Việt Nam (VINARES) cho thấy tỷ lệ kháng kháng sinh tăng cao — cụ thể, tỷ lệ vi khuẩn sinh Beta-lactamase phổ rộng tăng gấp 4 lần trong giai đoạn 2016–2017 so với 2012–2013 [26]. Những xu hướng này phản ánh thách thức lớn của hệ thống y tế quốc gia trong việc đối phó với tình trạng kháng kháng sinh (AMR).

Trước thực trạng đó, các nhà hoạch định chính sách và cơ quan liên quan đã ban hành nhiều chiến lược, chương trình hành động và bố trí kinh phí nhằm kiểm soát và ngăn ngừa sự lan rộng của AMR [12]. Với sự hỗ trợ từ các nguồn tài trợ quốc tế và Bộ Y tế Việt Nam, nhiều hệ thống giám sát như VINARES và SOAR (Survey of Antibiotic Resistance – Khảo sát về kháng kháng sinh) đã được thiết lập để theo dõi tỷ lệ kháng thuốc của các tác nhân gây bệnh quan trọng trong bệnh viện [27]. Tại các bệnh viện Việt Nam, tỷ lệ kháng thuốc ngày càng tăng ở các chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* kháng carbapenem (CRAB), *P.aeruginosa* kháng carbapenem (CRPA), *Escherichia coli* kháng cephalosporin thế hệ 3 (3GCREC), *K. pneumoniae* kháng cephalosporin thế hệ 3 (3GCRKP), và *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) đã đạt mức báo động [27]. Đáng chú ý, những tác nhân này đều nằm trong danh mục “tác nhân ưu tiên” của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) được công bố vào các năm 2017 và 2024, nhấn mạnh sự cần thiết cấp bách của các nghiên cứu chẩn đoán phát hiện và phương pháp điều trị mới nhằm đối phó với các nhiễm khuẩn kháng thuốc.

1.2. Các phương pháp phát hiện và định lượng vi khuẩn *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae*

Kiểm tra bằng kính hiển vi, nhận dạng sinh hóa và thiết bị phát hiện vi khuẩn tự động như hệ thống VITEK 2 thường được sử dụng để phát hiện vi khuẩn dựa trên hệ thống kiểu hình. Tuy nhiên, chúng có độ nhạy thấp và tốn nhiều thời gian do phải ủ trong vài ngày [28]. Gần đây, các nhà khoa học đã phát triển các phương pháp thay thế, bao gồm MALDI-TOF MS [29], thể thực khuẩn phát quang [30]. Phép đo phổ MALDI-TOF MS là một kiểu ion hóa khối phổ mới, được sử dụng để lập bản đồ phổ protein của vi sinh vật. Dữ liệu khối phổ của vi sinh vật lâm sàng được so sánh với cơ sở dữ liệu protein tiêu chuẩn của hơn 8000 chủng vi sinh vật đã biết để đạt được mục đích xác định. Phân tích MALDI TOF MS cho phép định danh chính xác loài vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn gram âm, gram dương, vi khuẩn kỵ khí, vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc... Do tính nhanh chóng, chính xác, nhạy, tự động và thông lượng cao, MALDI-TOF MS đã trở thành một công nghệ xác định nhanh vi sinh vật được sử dụng trong chẩn đoán lâm sàng, giám sát môi trường và các nghiên cứu phân loại vi sinh.

Ngoài ra, các phương pháp miễn dịch học, bao gồm xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA), kiểm tra miễn dịch (IBT), miễn dịch huỳnh quang, điện di miễn dịch và xét nghiệm phóng xạ pha rắn cũng đã được sử dụng. Các kỹ thuật miễn dịch học sử dụng liên kết đặc hiệu cao giữa các kháng thể và kháng nguyên, tạo điều kiện cho việc phát hiện định tính hoặc phát hiện định lượng dựa trên

các phản ứng cụ thể do sự bắt cặp kháng nguyên- kháng thể. Kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch hiện đại đã đạt được sự phát hiện có độ nhạy cao và đã được phát triển thành nhiều loại phương pháp xét nghiệm miễn dịch bằng cách đưa thêm vào các phản ứng xúc tác bằng enzym, huỳnh quang hoặc đồng vị ghi nhãn như một thước đo cụ thể về sự bắt cặp kháng nguyên-kháng thể [31].

Phương pháp phổ biến thứ hai được dùng là thử nghiệm sinh học phân tử. Các phương pháp cụ thể bao gồm phương pháp khuếch đại gen PCR thông thường, PCR định lượng thời gian thực dựa trên huỳnh quang, PCR đa hợp, kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) sử dụng đầu dò axit nucleic peptit (PNA), phương pháp phát hiện tại chỗ dựa trên aptamer, phương pháp PCR-ELISA. Cùng với sự phát triển của phương pháp PCR trong những năm 1980 và sự phát triển liên tục của phương pháp sinh học phân tử, nhiều phương pháp xét nghiệm sinh học phân tử hiệu quả đã được áp dụng rộng rãi cho việc phát hiện mầm bệnh và cung cấp cơ sở kỹ thuật cho điều tra dịch tễ học, phát hiện mầm bệnh, và kiểu gen của mầm bệnh. Với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, phương pháp dựa trên sinh học phân tử giúp phát hiện nhanh chóng các loại vi khuẩn gây nhiễm khuẩn bệnh viện hiện nay. Đối với việc xét nghiệm để phát hiện chủng *K. pneumoniae*, phương pháp LAMP cho thấy giới hạn phát hiện thấp hơn 10.000 lần so với phương pháp PCR, đồng thời độ nhạy cũng được báo cáo là cao hơn đối với một số chủng được thử nghiệm [32]. Phương pháp LAMP cũng thể hiện sự ưu việt trong việc có thể quan sát thông qua sự quan sát độ đục của dịch phản ứng bằng mắt thường để định tính sự có mặt hay không của gen gây bệnh. Nghiên cứu phát triển phương pháp LAMP đặc hiệu cho *P. aeruginosa*, sử dụng gen mã hóa một protein giả định đặc hiệu làm đích. Tác giả thu thập 52 mẫu môi trường tại Thành phố Hồ Chí Minh, trong đó 5 chủng được xác nhận là *P. aeruginosa* bằng giải trình tự gen 16S rRNA. Phương pháp LAMP đạt độ đặc hiệu 100% và giới hạn phát hiện được báo cáo là 1 pg/ μ L [33]. Việc sử dụng phương pháp LAMP để phát hiện ra *P. aeruginosa* cũng đã được đem ra so sánh với phương pháp PCR truyền thống trong một công bố vào năm 2019 [34]. Nghiên cứu chỉ ra rằng độ đặc hiệu của phương pháp LAMP tương đương với PCR, trong 150 mẫu thuộc chủng *P. aeruginosa* và 170 mẫu không thuộc chủng *P. aeruginosa*. Các mẫu dương tính được đem đi pha loãng theo bậc lần lượt để kiểm tra độ nhạy của phương pháp. Kết quả chỉ ra rằng xét nghiệm LAMP có thể đạt tới độ nhạy là 100 bản sao cho mỗi phản ứng. Một công bố khác đồng thời trong năm 2019 nghiên cứu ở các chủng gây nhiễm khuẩn bệnh viện (bao gồm cả *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*) từ các mẫu dịch rửa phế quản, phế nang (BAL), nội khí quản (EA) và dịch hút phế quản (BAS), với quy mô là 58 mẫu BAL và 83 mẫu EA/BAS dương

tính đã được thử nghiệm [35]. Đối với các mẫu BAL, phương pháp LAMP cho kết quả độ đặc hiệu lên tới 100% và độ nhạy là 86.3% (giá trị dự đoán dương tính là 100% và giá trị dự đoán âm tính là 50%) so với phương pháp nuôi cấy truyền thống. Trong khi đó, đối với các mẫu BAS/EA, xét nghiệm cho thấy độ đặc hiệu là 100% và độ nhạy là 94.6% (giá trị dự đoán dương tính là 100% và giá trị dự đoán âm tính là 69.2%). Có thể thấy, phương pháp này có thể dễ dẫn tới dương tính giả. Thêm vào đó, tuy thời gian đã rút ngắn hơn nhiều so với phương pháp nuôi cấy truyền thống và PCR thông thường, nhưng thời gian để hoàn thành xét nghiệm vẫn có thể lên tới 2 giờ đồng hồ. Đối với việc sử dụng phương pháp ELISA cho việc phát hiện mầm bệnh của *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa* cũng đã có rất nhiều nghiên cứu được công bố. Một nghiên cứu vào năm 2021 sử dụng đối tượng nghiên cứu là dê để chuẩn đoán mầm bệnh của *K. pneumoniae* đã công bố giá trị ngưỡng (cut-off value) của phương pháp là 0.28 với độ nhạy phân tích đạt tới $2,99 \times 10^7$ CFUs/mL [36]. Sự kết hợp giữa phương pháp PCR và ELISA cũng là một hướng đã được khai thác trong việc phát hiện *P. aeruginosa* từ các mẫu lấy từ các chai cấy máu BACTEC dương tính [37]. Các đoạn mồi PCR được thiết kế để nhắm mục tiêu trình tự 249 bp của gen *oprI* ở *P. aeruginosa*. Đầu dò được đánh dấu biotin (PA3) nhắm mục tiêu đến mô típ cụ thể của loài đã được lai với các sản phẩm khuếch đại được gắn nhãn digoxigenin từ *P. aeruginosa* và được bắt trên các đĩa vi mô phủ streptavidin. Ở đây, PCR-ELISA được chứng minh là có độ đặc hiệu cao để xác định *P. aeruginosa* và nhạy hơn gấp 10 lần so với phương pháp phát hiện dựa trên gel agarose bằng cách sử dụng cùng một cặp mồi, với giới hạn phát hiện ở 10 fg mẫu. Phương pháp PCR-ELISA được phát triển trong nghiên cứu này có độ nhạy và độ đặc hiệu đạt tới 100% đối với 73 mẫu đối chứng dương, 42 mẫu đối chứng âm cũng như với 25 mẫu lâm sàng chưa xác định. Nó giúp làm giảm đáng kể thời gian để xác định mầm bệnh *P. aeruginosa* từ các chai cấy máu BACTEC dương tính từ 2-3 ngày xuống 6-8 giờ. Nhưng phương pháp ELISA thì đòi hỏi thiết bị đặc thù với chi phí cũng không hề thấp với thời gian tiến hành cũng không phải là ngắn. Đặc biệt vào cuối năm 2021, một công bố khoa học trong việc sử dụng kết hợp của phương pháp khuếch đại hỗ trợ tái tổ hợp và dòng chảy bên (RAA-LFD) đã đưa ra những con số khá ấn tượng về giới hạn phát hiện và độ đặc hiệu của phương pháp. Phương pháp RAA-LFD có độ đặc hiệu cao đối với *K. pneumoniae* và không cho thấy phản ứng chéo với các mầm bệnh khác. Ngoài ra, giới hạn phát hiện của RAA-LFD đối với *K. pneumoniae* là 20 fg genomic DNA và $2,5 \times 10^2$ CFU/mL của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy thuần khiết, cao hơn 100 lần so với PCR. Ngoài ra, độ chính xác phát hiện của RAA-LFD cao hơn so với phương pháp PCR (95,3%) [38]. Tuy vậy, thời gian để áp dụng phương pháp vẫn lên tới vài

giờ đồng hồ. Ngoài ra, hiện tại còn có các phương pháp dựa vào phát hiện sản phẩm chuyển hóa tạo ra bởi *K. pneumoniae* và *P. aeruginosa*, là các dấu ấn sinh học đặc trưng của chúng. Đối với *K. pneumoniae*, dấu ấn sinh học được lựa chọn là các peptide được sản sinh ra trong huyết thanh. Chúng được phân tích dựa vào các khối phổ thông qua chạy máy LC-MS (MALDI-TOF MS) trong một công bố vào năm 2021. Độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của mô hình được xác định lần lượt là 79,66%, 81,48% và 78,12% [39]. Còn đối với *P. aeruginosa*, pyocyanin chính là một dấu ấn sinh học quan trọng đối với mầm bệnh này. Cuối năm 2020, một nhóm tác giả đã đưa ra một bài tổng quan về việc ứng dụng điện hóa trong việc phát hiện pyocyanin [40]. Trong bài báo, một thống kê chi tiết về các loại vật liệu và ngưỡng giới hạn đã được trình bày rõ ràng. Carbon được thống kê là điện cực hiệu quả nhất với ngưỡng phát hiện tuyến tính là 0-100 μM với nồng độ của pyocyanin. Việc áp dụng phương pháp này cho các mẫu lâm sàng đã thực sự thành công. Kết quả điện hóa được kiểm nghiệm so sánh với kết quả từ phương pháp sinh học phân tử, cho thấy độ nhạy 71% và độ đặc hiệu là 57% để phát hiện *P. aeruginosa*. Ứng dụng phương pháp điện hóa này, một công bố khoa học năm 2020 đã xây dựng một mô hình thiết bị vô cùng đơn giản để có thể xác định mầm bệnh *P. aeruginosa* từ dịch tiết của người, nước sinh hoạt, bề mặt nhiễm khuẩn cũng như môi trường LB nuôi cấy với hàm lượng pyocyanin đặt mức nmol/L , tương đương một lượng nhỏ tế bào vi khuẩn (~ 100 tế bào) trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, các phương pháp trên đều có những ưu điểm riêng nhưng vẫn tồn tại mặt hạn chế do nguy cơ ô nhiễm mẫu vẫn chưa được giải quyết, tiêu tốn rất nhiều thời gian, lao động và chi phí, đòi hỏi nhân viên được đào tạo để thực hiện các xét nghiệm thường này. Vì vậy, các phương pháp xét nghiệm này thường được thực hiện tại các cơ sở y tế tuyến trung ương, khó phổ biến ở các cơ sở y tế địa phương.

Các phương pháp miễn dịch như ELISA ứng dụng hạt nano (nano-ELISA) và sắc ký miễn dịch dòng chảy bên (LFIA) đã được ứng dụng rộng rãi trong phát hiện vi sinh vật nhờ thời gian phân tích nhanh, chi phí thấp và khả năng triển khai trong lâm sàng. Tuy nhiên, các phương pháp này phụ thuộc vào kháng thể, vốn có tính ổn định và độ tái lập hạn chế, làm giảm hiệu quả trong những điều kiện ứng dụng thực tế. Trong bối cảnh đó, các hệ thống phát hiện dựa trên aptamer và cảm biến sinh học (biosensor) đang nổi lên như giải pháp thay thế tiềm năng cho kháng thể nhờ độ đặc hiệu cao, khả năng tổng hợp nhân tạo, chi phí thấp và độ bền vượt trội.

1.3. Aptamer: đặc điểm, phương pháp sàng lọc và ứng dụng trong phát hiện vi khuẩn

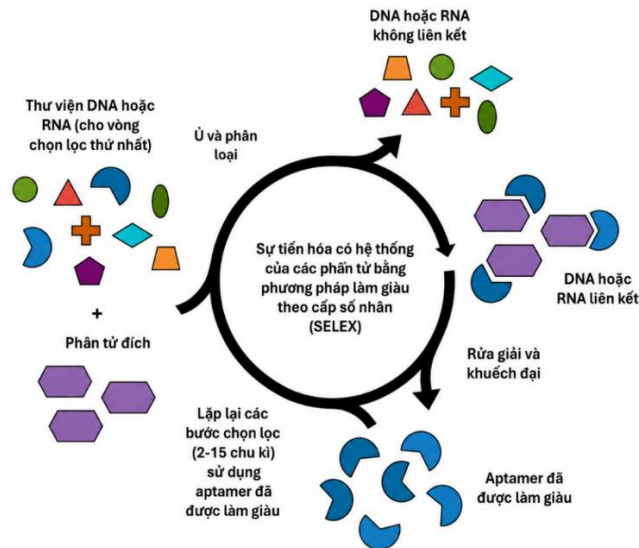
Aptamer được phát hiện lần đầu vào năm 1990 thông qua hai nghiên cứu độc lập của Ellington và Szostak và của Tuerk và Gold. Ellington và Szostak chứng minh khả năng lựa chọn các RNA có khả năng liên kết đặc hiệu với các phân tử nhỏ, trong khi Tuerk và Gold phát triển phương pháp Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) để lựa chọn các ligand acid nucleic có ái lực cao với phân tử đích. Hai công trình này đặt nền móng cho sự phát triển của công nghệ aptamer hiện đại [41]. Aptamer có thể có bản chất là DNA hoặc RNA và thường được lựa chọn từ các thư viện oligonucleotide tổng hợp có độ đa dạng trình tự rất lớn bằng các phương pháp chọn lọc *in vitro*, phổ biến nhất là kỹ thuật SELEX [42]. DNA aptamer thường có ưu điểm về độ ổn định hóa học và khả năng chống lại sự phân hủy bởi nuclease tốt hơn RNA trong nhiều điều kiện. DNA cũng thuận lợi cho tổng hợp hóa học, khuếch đại bằng PCR và tạo lại dạng mạch đơn sau mỗi vòng SELEX. Do đó, DNA aptamer được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu phát triển phân tử nhận biết cho hệ thống phát hiện sinh học. RNA aptamer có khả năng tạo ra các cấu trúc bậc ba phức tạp nhờ sự linh hoạt của đường ribose và nhóm 2'-OH. Đặc điểm này cho phép RNA aptamer hình thành các cấu trúc liên kết đa dạng và nhận biết nhiều loại phân tử đích. Tuy nhiên, độ nhạy với RNase là một hạn chế quan trọng, đặc biệt khi ứng dụng trong các mẫu sinh học phức tạp. Các chiến lược biến đổi hóa học nucleotide đã được phát triển nhằm cải thiện độ bền của RNA aptamer. Khác với các đoạn acid nucleic chỉ đóng vai trò lưu trữ hoặc truyền đạt thông tin di truyền, các aptamer hoạt động như các phân tử nhận biết phân tử, có khả năng phân biệt và liên kết với các phân tử đích có đặc điểm cấu trúc phù hợp [43].

Hiện nay, việc sử dụng aptamer gắn đặc hiệu phân tử đích đã được sử dụng rộng rãi do nhiều đặc điểm vượt trội hơn so với kháng thể. Những ưu điểm này bao gồm nhưng không giới hạn ở (1) chi phí tổng hợp *in vitro* thấp, (2) khả năng dễ dàng hoạt hóa với các chất khác nhau như fluorophores và vật liệu nano, (3) ái lực liên kết với phân tử đích cao, (4) độ chọn lọc phân tử đích cao, và (5) ổn định tại nhiệt độ phòng [44,45]. Các thuộc tính này của aptamers tạo cơ hội thay thế các kháng thể bằng aptamers ở tất cả các kỹ thuật chẩn đoán có thể có [46]. Hơn nữa, trái ngược với kháng thể, aptamer có thể được tạo ra để gắn đặc hiệu với bất kỳ phân tử nào bất kể kích thước hoặc khả năng sinh miễn dịch của nó [47]. Do đó, công nghệ này đã được sử dụng một cách phổ biến để tạo ra aptamer để gắn đặc hiệu với các phân tử đích khác nhau, từ các ion (Hg, As), các phân tử nhỏ (thuốc trừ sâu, axit amin, kháng sinh),

protein, enzyme và thậm chí để gắn đặc hiệu với các tế bào vi khuẩn và ung thư [48]. Một đặc điểm quan trọng của aptamer là khả năng tự cuộn gập (folding) thành cấu trúc không gian đặc hiệu. Mặc dù là các polymer mạch đơn tương đối linh động, trình tự nucleotide của aptamer không tồn tại hoàn toàn ở trạng thái kéo dài mà có thể tự tương tác thông qua bắt cặp base và các tương tác nội phân tử khác, từ đó hình thành các cấu trúc thứ cấp và bậc cao hơn. Chính quá trình cuộn gập này tạo nên các bề mặt và hốc liên kết có hình dạng, điện tích và đặc tính hóa học phù hợp với phân tử đích [49]. Đặc biệt đối với protein, các cấu trúc ba chiều của aptamer có thể tạo nên bề mặt tiếp xúc với epitope tương tự như cách vùng nhận diện của kháng thể tương tác với kháng nguyên. Cấu trúc linh động của khung xương đường phosphat cho phép các nucleotide được định hướng trong không gian, đưa các nhóm chức phù hợp đến gần các vị trí tương tác trên phân tử đích [50]. Sau khi hình thành cấu trúc không gian phù hợp, aptamer nhận biết và liên kết với phân tử đích thông qua sự phối hợp của nhiều loại tương tác không cộng hóa trị. Các tương tác thường gặp bao gồm liên kết hydro, tương tác tĩnh điện, tương tác Van der Waals, tương tác kỵ nước và tương tác xếp chồng π - π giữa các base thơm và các nhóm chức hoặc vòng thơm của phân tử đích. Không một loại tương tác đơn lẻ nào nhất thiết quyết định toàn bộ ái lực; thay vào đó, nhiều tương tác yếu có thể phối hợp tạo nên phức hợp aptamer-phân tử đích có độ ổn định cao [51].

Để sàng lọc aptamer, quy trình SELEX thường bao gồm các bước sau: Thư viện axit nucleic được trộn với phân tử đích để tạo thành một phức hợp, axit nucleic liên kết được thu thập từ hỗn hợp không liên kết bằng cách sử dụng vật liệu phân tách (vách ngăn). Sau đó, các axit nucleic đã tạo thành phức hợp được rửa giải khỏi phân tử đích liên kết để khuếch đại các ứng viên aptamer (khuếch đại), và ssDNA được tách ra khỏi sợi khác để tiến tới vòng SELEX tiếp theo (tách). Các chu kỳ này được lặp lại cho đến khi phân lập được các phân tử axit nucleic có ái lực liên kết cao và các đặc tính riêng cho phân tử đích [52]. Trong quy trình SELEX, bước tách chiết các phân tử aptamer đặc hiệu từ hỗn hợp các phân tử aptamer không đặc hiệu là điều cần thiết để chọn lọc thành công. Kể từ năm 1990, khi công nghệ SELEX lần đầu tiên được giới thiệu, các kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để tăng tính đặc hiệu của phản ứng. Nói chung, các phương pháp SELEX truyền thống thường dựa trên việc “lọc” và “làm sạch cột” với phương pháp lọc sử dụng màng nitrocellulose làm vật liệu ái lực và loại bỏ các phân tử axit nucleic không liên kết bằng bộ lọc. Phương pháp làm sạch cột sử dụng một cột có mục tiêu cố định bắt giữ các ứng viên aptamer trong dòng thư viện axit nucleic đi qua. Những kỹ thuật này có những hạn chế, chẳng hạn như khả năng tương tác không đặc hiệu của các axit nucleic với vật liệu có ái lực

dẫn đến năng suất và độ tinh khiết thấp và tốn nhiều thời gian. Trong nỗ lực khắc phục những hạn chế này, các phiên bản sửa đổi của SELEX đã được phát triển để tăng độ tinh khiết và năng suất của các aptamers đặc hiệu và tạo điều kiện thuận lợi cho mỗi bước SELEX [53]. Quy trình SELEX được thực hiện như mô tả trong **Hình 1.4**.



Hình 1.4. Quy trình SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) [54]

Các phương pháp SELEX hiện nay đang được phát triển bao gồm: IP-SELEX (immunoprecipitation-coupled SELEX), capture-SELEX, cell-SELEX, CE-SELEX (capillary electrophoresis-SELEX), M-SELEX (microfluidic-SELEX), AFM-SELEX (atomic force microscopy-SELEX), AEGIS-SELEX (Artificially Expanded Genetic Information System-SELEX), Animal-SELEX. Ưu và nhược điểm của các phương pháp này được liệt kê trong **Bảng 1.1**.

Bảng 1.1. Đặc điểm, ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp SELEX [54]

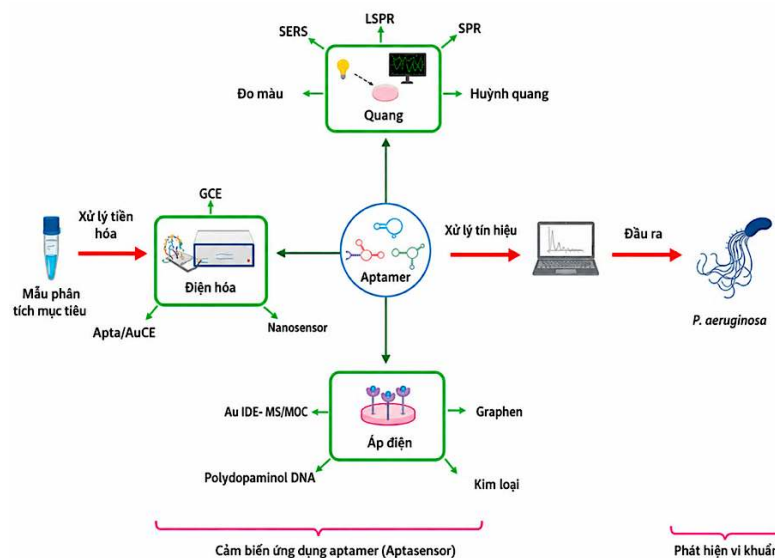
Phương pháp	Đặc điểm	Ưu điểm	Nhược điểm
IP-SELEX	Gồm kết tủa miễn dịch	Chọn lọc aptamer đặc hiệu protein dưới điều kiện sinh lý tự nhiên, giúp làm tăng ái lực liên kết và độ đặc hiệu	Tốn nhiều thời gian hơn phương pháp SELEX truyền thống

Capture-SELEX	Thư viện oligonucleotide được cố định lên giá thay vì phân tử đích, để chọn lọc aptamer đặc hiệu các phân tử nhỏ hòa tan	Phù hợp để chọn lọc aptamer đặc hiệu các phân tử nhỏ. Không cần phải cố định phân tử đích Được sử dụng cho mục đích phát hiện các aptamer chuyển đổi cấu trúc	Một số oligonucleotide từ thư viện có thể không được chọn lọc
Cell-SELEX	Sử dụng toàn bộ tế bào sống làm đích để chọn lọc aptamer	Không yêu cầu nghiên cứu trước về đích Aptamer được chọn lọc đặc hiệu ở trạng thái tự nhiên Nhiều đích tiềm năng có mặt trên bề mặt của tế bào sống Không yêu cầu tinh sạch protein	Yêu cầu trình độ chuyên môn cao Tốn chi phí và thời gian thực hiện
CE-SELEX	Bao gồm sự phân tách ion dựa vào sự di chuyển của điện tích	Thời gian thực hiện nhanh chóng (chỉ khoảng 1-4 chu kì chọn lọc) Giảm sự liên kết không đặc hiệu Không cần phải cố định phân tử đích	Không phù hợp cho các phân tử nhỏ Đòi hỏi thiết bị đắt tiền
M-SELEX	Kết hợp SELEX với hệ thống vi lỏng	Thời gian thực hiện nhanh chóng và hiệu quả (chỉ cần một lượng ít hóa chất) Phù hợp với các phân tử nhỏ Có thể chạy tự động	Độ tinh sạch thấp Yêu cầu cố định phân tử đích
AFM-SELEX	Sử dụng kính hiển vi lực nguyên tử (atomic force microscopy – AFM) để tạo hình ảnh ba chiều của bề mặt mẫu	Có thể tinh sạch aptamer với ái lực cao Thời gian thực hiện nhanh chóng (chỉ khoảng 3-4 chu kì chọn lọc)	Đòi hỏi thiết bị đắt tiền Yêu cầu cố định phân tử đích và aptamer
AEGIS-SELEX	Sử dụng thư viện với mã di truyền mở rộng nhân tạo	Aptamer được chọn lọc với độ đặc hiệu cao	Không nhận biết được các base đã bị biến tính bởi DNA polymerases

		Các aptamer được chọn lọc gắn với đích trong môi trường tự nhiên của chúng	
Animal-SELEX	Aptamer được chọn lọc trực tiếp trong cơ thể mô hình động vật sống	Không yêu cầu nghiên cứu trước về phân tử đích	Tốn nhiều thời gian thực hiện
		Tối thiểu hóa các bước tối ưu	

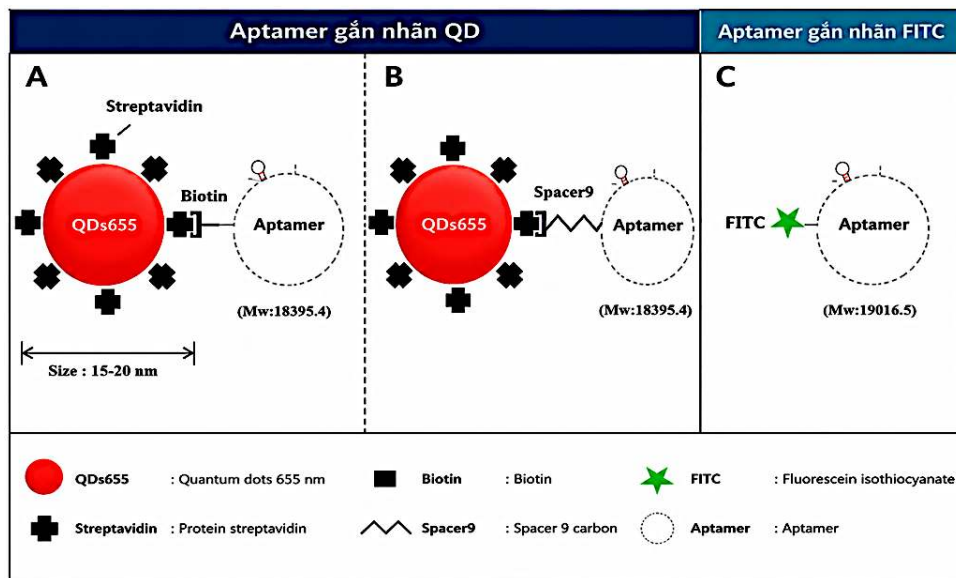
Các aptamer được lựa chọn qua quá trình SELEX với ái lực và tính đặc hiệu cao có thể tiếp tục được khai thác như các phân tử nhận biết sinh học trong các hệ thống cảm biến sinh học. Sự kết hợp giữa khả năng nhận diện đặc hiệu của aptamer và các cơ chế chuyển đổi tín hiệu đã tạo cơ sở cho sự phát triển của các cảm biến dựa trên aptamer (aptasensor), mở rộng khả năng ứng dụng aptamer trong phát hiện và chẩn đoán sinh học. Trong lĩnh vực phát hiện vi sinh vật, aptasensor đã được nghiên cứu như một hướng tiếp cận tiềm năng nhằm phát triển các phương pháp phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu các vi khuẩn gây bệnh. Aptamer có thể được thiết kế để nhận diện trực tiếp các thành phần đặc trưng trên bề mặt tế bào, như protein màng ngoài, polysaccharide, lipopolysaccharide (LPS), các yếu tố độc lực hoặc toàn bộ tế bào vi khuẩn sau đó được tích hợp với các hệ thống chuyển đổi tín hiệu quang học, điện hóa hoặc vật liệu nano để tạo tín hiệu phát hiện.

Nhằm phát hiện sự có mặt của *P.aeruginosa*, nhiều aptamer đặc hiệu đã được phân lập. Là các phân tử nhận dạng sinh học đặc hiệu, các aptamer đã cung cấp các công cụ hiệu quả cho phát hiện nhanh, chẩn đoán sớm và hướng tới việc điều trị trúng đích đối với *P. aeruginosa*.



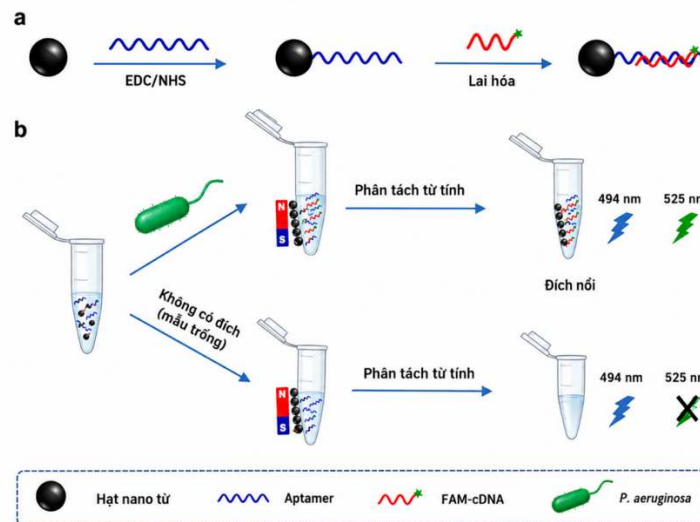
Hình 1.5. Các loại cảm biến sinh học dựa trên aptamer phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* [55]

Việc tích hợp một aptamer làm thụ thể sinh học với một bộ chuyển đổi quang học sẽ tạo ra một cảm biến aptamer quang học. Cảm biến aptamer quang học được phân loại thành huỳnh quang [56], cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) [57], cộng hưởng plasmon bề mặt cục bộ (LSPR) [58], đo màu [59] và tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) [60]. Các loại cảm biến phát hiện *P.aeruginosa* được mô tả trên **Hình 1.5**. Cảm biến sinh học dựa trên aptamer (aptasensor) sử dụng huỳnh quang được phát triển ứng dụng fluorescein isothiocyanate (FITC) và quantum dot (QD) để gắn nhãn aptamer giúp phát hiện *P.aeruginosa*, mô hình liên hợp aptamer gắn nhãn FITC và QD được mô tả trên **Hình 1.6**. Phương pháp này có thể phát hiện được cả tế bào vi khuẩn trong nước uống với giới hạn phát hiện là 5,07 tế bào/mL, giới hạn định lượng là 5,64 tế bào/mL và giới hạn tuyến tính là 100 tế bào/mL [61].



Hình 1.6. Mô hình aptamer gắn nhãn huỳnh quang với QD và FITC (A) liên hợp của QD và aptamer không chứa spacer (B) chứa spacer (C) FITC-gắn nhãn aptamer [61]

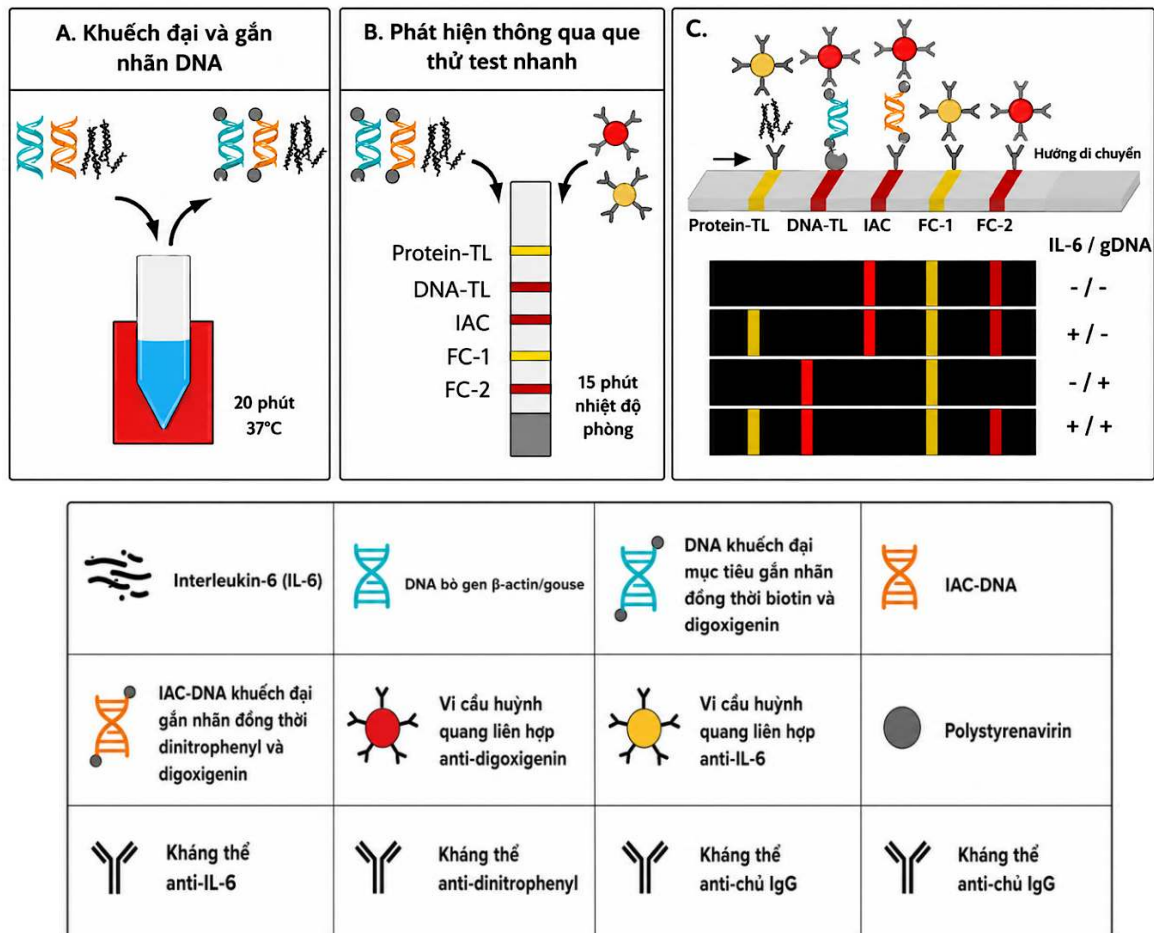
Một mô hình aptasensor gắn nhãn huỳnh quang khác được ứng dụng đó là lai aptamer với sợi DNA bổ sung đánh dấu carboxyfluorescein (FAM-cDNA) kết hợp với phân tách từ tính [62]. Sau khi phân tách từ tính, lượng vi khuẩn có thể được định lượng bằng cách xác định cường độ huỳnh quang ($\lambda_{exc/em} = 494/525$ nm) của dịch nổi phía trên có chứa FAM-cDNA. Phương pháp phát hiện này cho phép làm giàu chọn lọc và xác định vi khuẩn bằng phép đo huỳnh quang nhạy trong một bước duy nhất. Xét nghiệm có phản ứng tuyến tính với logarithm của nồng độ *P. aeruginosa* trong khoảng từ 10 đến 10^8 CFU/mL, với giới hạn phát hiện đến 1 CFU/mL. Quá trình phát hiện có thể được thực hiện trong vòng 1,5 giờ. Mô hình gắn aptamer&FAM-cDNA và quy trình phát hiện *P.aeruginosa* đã được mô tả cụ thể trên **Hình 1.7**.



Hình 1.7. Mô hình (a) aptamer&FAM-cDNA@MNPs (b) phương pháp phát hiện *P.aeruginosa* [62]

Một aptasensor khác để chẩn đoán *P.aeruginosa* là loại cảm biến được phát triển bằng cách sử dụng các chấm carbon phát quang (carbon dots - CD), là các đầu dò huỳnh quang và đối với nguyên tố quenching, graphene oxide (GO) đã được sử dụng. Cảm biến aptasensor này có thể phát hiện *P.aeruginosa* trong các mẫu nước với giới hạn là 9 CFU/mL và với khoảng phát hiện từ 10^0 đến 10^7 CFU/mL [63]. Đối với các cảm biến điện hóa, một aptasensor điện hóa sử dụng các hạt chitosan có kích thước nano (NCs) đã được phát triển để phát hiện *P.aeruginosa* với độ nhạy cao. Giới hạn phát hiện của cảm biến này là 3 CFU/mL và phạm vi tuyến tính là từ 10^1 đến 10^7 CFU/mL. Aptamer đặc hiệu với *P.aeruginosa* được gắn cộng hóa trị với bề mặt điện cực carbon thủy tinh, được biến tính bằng NCs. Aptasensing trong nền tảng này được đo lường thông qua phương pháp quang phổ trở kháng điện hóa (electrochemical impedance spectroscopy) và phương pháp von kế tuần hoàn (cyclic voltammetry) [64]. Trong một nghiên cứu khác, một Aptasensor điện hóa dựa trên NanoZyme có độ nhạy cao để phát hiện nhanh *P.aeruginosa* trong nước đã được phát triển với giới hạn phát hiện là ~60 CFU/mL và phạm vi tuyến tính từ 60,0 đến $6,0 \times 10^7$ CFU/mL. Trong nền tảng cảm biến nano này, tính năng NanoZyme giống như peroxidase của các hạt nano vàng đã được sử dụng và được tích hợp với các aptamer đặc hiệu với *P.aeruginosa* [65]. Trong một nghiên cứu khác, hai aptamer đã được chọn lọc đặc hiệu với peptidoglycan của các tác nhân gây nhiễm trùng huyết (bốn vi khuẩn gram dương và bảy vi khuẩn gram âm), trong đó có hai vi khuẩn *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae* với hiệu quả liên kết cao, aptamer có giá trị hằng số ái lực (affinity constant K_d) lớn đối với *K.pneumoniae* là 256.10 ± 47.89 nM [66]. Đối với việc phát hiện nhanh *P.aeruginosa*, một nghiên cứu đã báo cáo về việc phát triển xét nghiệm

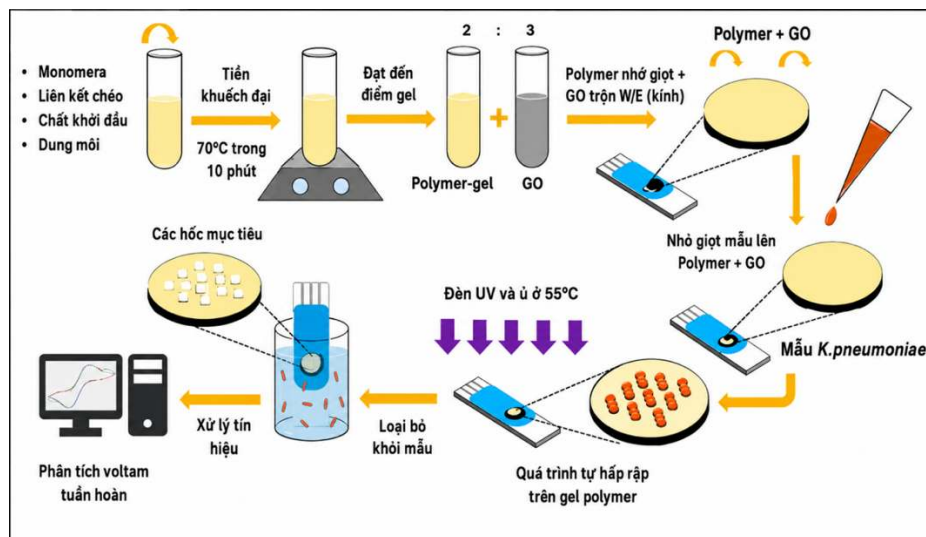
multianalyte phát hiện các chỉ dấu sinh học gây viêm và DNA của mầm bệnh đồng thời từ cùng một mẫu trong vòng 35 phút. Quá trình khuếch đại và gắn nhãn tương thích với protein biến thông tin acid nucleotide thành nguyên tắc đo lường để phát hiện protein. Sự kết hợp với khả năng phát hiện nhanh thông qua xét nghiệm miễn dịch dòng chảy bên cho phép phân tích nhanh chóng và đơn giản nhiều lớp phân tử sinh học sử dụng các điều kiện xét nghiệm giống hệt nhau. Để chứng minh tính khả thi của Xét nghiệm Multianalyte, cytokine tiền viêm interleukin-6 (IL-6) và gDNA của mầm bệnh cơ hội *P.aeruginosa* được sử dụng. Giới hạn phát hiện là 4 ng/mL IL-6 và 70 bản sao/phản ứng *P. aeruginosa* gDNA đáp ứng phạm vi phù hợp về mặt lâm sàng và do đó, có tiềm năng to lớn trong việc phát hiện nhanh *P.aeruginosa* để có các biện pháp điều trị kịp thời [67]. Nguyên lý hoạt động của que phát hiện đồng thời một số chỉ dấu DNA và protein phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* được mô tả cụ thể như trên **Hình 1.8**.



Hình 1.8. Nguyên lý của que thử phát hiện đồng thời một số chỉ dấu DNA và protein phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* [67]

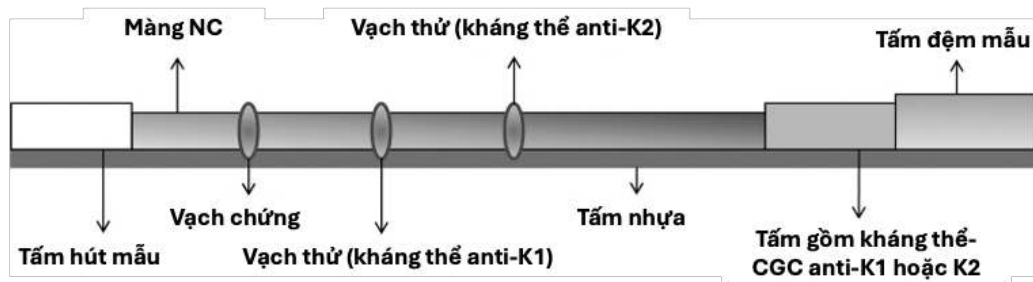
Đối với việc phát hiện *K. pneumoniae* nghiên cứu đã phát triển cảm biến sinh hóa dựa trên kỹ thuật MIP (molecularly imprinted polymer). Phát hiện định lượng được thực hiện bằng kỹ thuật điện hóa để đo sự thay đổi tín hiệu điện ở các vùng khác

nhau. Nồng độ *K. pneumoniae* dao động từ 10 đến 10^5 CFU/mL. Cảm biến *K. pneumoniae* dựa trên công nghệ MIP của được chứng minh là đạt được phản hồi tuyến tính cao, với giá trị R2 là 0,9919. Thử nghiệm độ nhạy cảm cũng được thực hiện trên vi khuẩn có cấu trúc tương tự như *K. pneumoniae*. Kết quả độ nhạy cho thấy cảm biến sinh học *K. pneumoniae* dựa trên MIP với điện cực vàng là nhạy nhất, với 7,51 (% nồng độ dòng điện/log tương đối) khi so sánh với cảm biến MIP được áp dụng với *P.aeruginosa* và *Enterococcus faecalis*, nơi độ nhạy lần lượt là 2,634 và 2,226. Cảm biến này cũng có thể đạt được giới hạn phát hiện (LOD) là 0,012 CFU/mL và giới hạn định lượng (LOQ) là 1,61 CFU/mL [68]. Nguyên lý hoạt động của cảm biến sử dụng công nghệ MIP được mô tả chi tiết như trên **Hình 1.9**.



Hình 1.9. Nguyên lý hoạt động của cảm biến dựa trên công nghệ MIP với sự chuẩn bị polymer-GO trên điện cực vàng nhằm phát hiện *K. pneumoniae* [68]

Đối với các công nghệ cảm biến phát hiện nhanh, L. Kristopher Siu và cộng sự [69] đã thiết kế và chế tạo được que thử sắc ký miễn dịch dựa trên hạt keo vàng phát hiện nhanh vi khuẩn *K.pneumoniae* trong hai loại huyết thanh K1 và K2. Kết quả cho thấy que thử có giới hạn phát hiện (LOD) là 10^5 CFU và lưu hành ổn định trong vòng 6 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng. Không có kết quả âm tính giả hoặc dương tính giả nào được quan sát và kết quả tương đương so với những phương pháp thử nghiệm thông thường như phương pháp PCR và phương pháp ngưng kết huyết thanh. Hơn nữa, chúng có ưu điểm là không đòi hỏi người sử dụng phải có chuyên môn kỹ thuật và cho phép phát hiện đặc hiệu, nhanh chóng và đồng thời các type huyết thanh K1 và K2 của vi khuẩn *K.pneumoniae*. Mô hình que thử phát hiện đồng thời các type huyết thanh K1 và K2 của vi khuẩn *K.pneumoniae* được mô tả chi tiết như trên **Hình 1.10**.

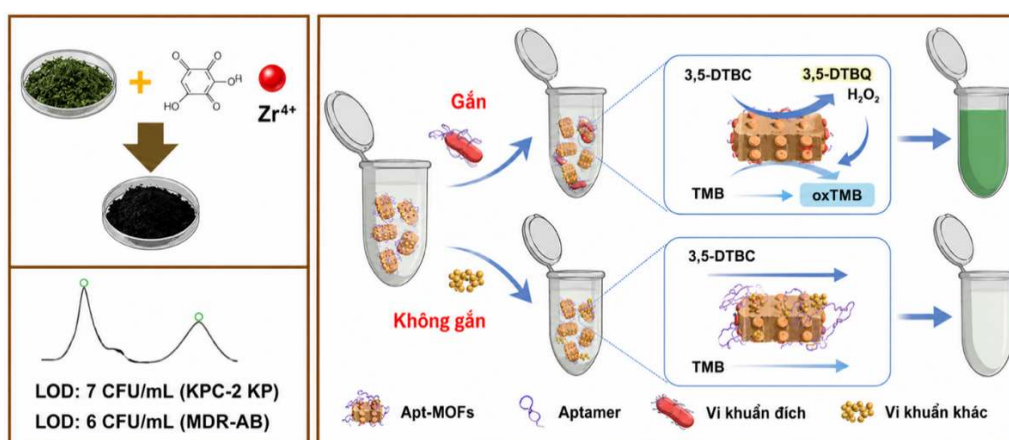


Hình 1.10. Các thành phần của que thử nhằm phát hiện K1 và K2 của vi khuẩn *K. pneumoniae* [69]

Một công trình nghiên cứu khác đã được công bố về cảm biến sinh học so màu sử dụng hạt nano vàng gắn nhãn để phát hiện mầm bệnh *K. pneumoniae* serotype K2 [70]. Với sự hiện diện của các DNA và các đầu dò oligonucleotide, màu sắc và bước sóng hấp phụ của các hạt nano vàng đã có sự thay đổi lớn, trong khoảng 550-650 nm. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy giới hạn phát hiện đạt 15×10^5 CFU/mL và 9 pg/ μ L, khi so sánh với giới hạn dưới của phương pháp PCR là 1 pg/ μ L. Thêm nữa, việc sử dụng hạt nano vàng giúp chỉ thị màu sắc rõ nét hơn, giảm được thời gian đo đạc cũng như các yêu cầu về thiết bị chạy và đọc gel. Một nghiên cứu khác công bố năm 2018 [71] về phương pháp xét nghiệm miễn dịch trên que thử dòng chảy bên được sử dụng để phát hiện nhanh vi khuẩn *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* và các vi khuẩn liên quan trong thực phẩm. Trong nghiên cứu này, hai kiểu phương pháp dựa trên các dải thử nghiệm đã được phát triển để phát hiện những vi khuẩn này một cách đơn giản và nhanh chóng. Một phương pháp sử dụng công nghệ que thử dòng chảy bên kết hợp với kháng thể kháng *Klebsiella* được đánh dấu bằng các hạt nano palladium liên kết với vi khuẩn mục tiêu, cho phép phát hiện sự có mặt của chúng. Phương pháp thứ hai, các kháng thể được cố định trên màng nitrocellulose và hoạt động của enzym urease được đo bằng cách sử dụng cảm biến pH sử dụng transistor hiệu ứng trường nhảy ion. Thử nghiệm sự kết hợp của hai phương pháp này được tiến hành trên 72 chủng nuôi cấy đã xác định thành công tất cả 25 chủng *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* và *Raoultella ornithinolytica*. Phương pháp này cũng xác định chính xác 76 trong số 77 (đạt tới 99%) chủng được phân lập từ thịt và bánh ngọt. Khi kết hợp với phương pháp tiên nuôi cấy, phương pháp này đã xác định chính xác 19 trong số 26 (73%) vi khuẩn mục tiêu trong thực phẩm. Những kết quả này cho thấy rằng sự kết hợp mới của các xét nghiệm trên cơ sở que thử sắc ký miễn dịch dòng chảy bên có thể hiệu quả cho việc giám sát tại chỗ sự nhiễm khuẩn của các nhà máy sản xuất thực phẩm và do đó tăng cường được mức độ an toàn thực phẩm.

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung phát triển các hệ cảm biến aptamer màu sắc (colorimetric aptasensor) ứng dụng nanoenzyme và vật liệu khung cơ kim (metal–

organic framework, MOF) nhằm nâng cao độ nhạy và tốc độ phát hiện vi sinh vật gây bệnh. Một trong những hướng đi nổi bật là cảm biến sử dụng cấu trúc MOF-on-MOF lai ghép, tiêu biểu như hệ Cu-MOF@PMOF(Fe) có hoạt tính tương tự peroxidase. Hệ thống này vận hành theo cơ chế khuếch đại dây chuyền, trong đó lõi Cu-MOF xúc tác oxy hóa catechol tạo H_2O_2 , và lớp vỏ PMOF(Fe) tiếp tục sử dụng H_2O_2 để oxy hóa cơ chất TMB, cho phép tạo tín hiệu kép ở 370 và 652 nm giúp nâng cao đáng kể giới hạn phát hiện (7 CFU/mL đối với chủng *K.pneumoniae* mang gen KPC-2) (**Hình 1.11**) [72]. Khi được chức năng hóa bằng aptamer đặc hiệu với từng chủng vi khuẩn, cảm biến cho phép bắt giữ và định lượng nhanh với độ nhạy cao (giới hạn phát hiện đến đơn vị CFU/mL) và thời gian phản ứng ngắn (<1 giờ). Hệ thống này cũng cho thấy hiệu suất phục hồi cao (91–112%) khi kiểm nghiệm trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng phức tạp như huyết thanh, dịch mật hay dịch não tủy, chứng minh tính ổn định và khả năng ứng dụng thực tế. Những kết quả này cho thấy việc tích hợp aptamer với vật liệu nano có hoạt tính enzyme là xu hướng đầy tiềm năng trong phát triển các nền tảng phát hiện vi sinh vật nhanh, nhạy và thích hợp cho chẩn đoán tại chỗ (POCT), mở ra triển vọng mới cho giám sát và kiểm soát nhiễm khuẩn do vi khuẩn đa kháng thuốc (MDR).



Hình 1.11. Sơ đồ minh họa nền tảng cảm biến dựa trên aptamer và vật liệu khung cơ kim có độ nhạy siêu cao trong phát hiện lâm sàng *K.pneumoniae* mang gen KPC-2 [72]

Với sự phát triển nhanh chóng, đã có nhiều bước đột phá đáng kể trong các quy trình tuyển chọn, tổng hợp và biến đổi cấu trúc aptamer, mở ra tiềm năng ứng dụng rộng rãi của chúng trong nhiều lĩnh vực. Aptamer sở hữu nhiều ưu điểm vượt trội như tính ổn định cao, độ đồng nhất tốt và chi phí sản xuất thấp, khiến chúng trở thành ứng viên đầy hứa hẹn trong các hệ thống cảm biến sinh học, đặc biệt là trong lĩnh vực xét nghiệm tại chỗ (POCT – Point-of-Care Testing). Hiện nay, nhiều loại cảm biến sinh

học dựa trên aptamer, được phát triển theo nhiều phương pháp khác nhau, đã được phê duyệt sử dụng trong lâm sàng hoặc đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng, minh chứng cho tiềm năng ứng dụng thực tế rộng lớn của công nghệ này.

1.4. Nguyên lý của kỹ thuật sắc ký miễn dịch LFIA và ELISA trực tiếp

LFIA là sự kết hợp của một hệ thống sắc ký (tách các thành phần của một hỗn hợp dựa trên sự khác biệt trong chuyển động của chúng dọc theo màng) và một phản ứng sinh hóa (giữa kháng thể-kháng nguyên hoặc phân tử đích axit nucleic) [73]. Cả kháng thể và axit nucleic đều có thể được sử dụng làm đầu thu sinh học để phát triển que thử LFIA. Các LFIA được gọi là xét nghiệm miễn dịch dòng chảy bên khi kháng thể được sử dụng làm đầu thu sinh học. Trong quá trình phát hiện, mẫu chất lỏng hoặc dịch chiết chứa chất phân tích mục tiêu di chuyển qua màng thông qua lực mao dẫn [74]. Một dải LFIA điển hình bao gồm bốn màng xếp chồng lên nhau đã được dán trên tấm lót dính để hoạt động ổn định và dễ dàng xử lý. Bốn màng tạo nên một dải LFIA bao gồm:

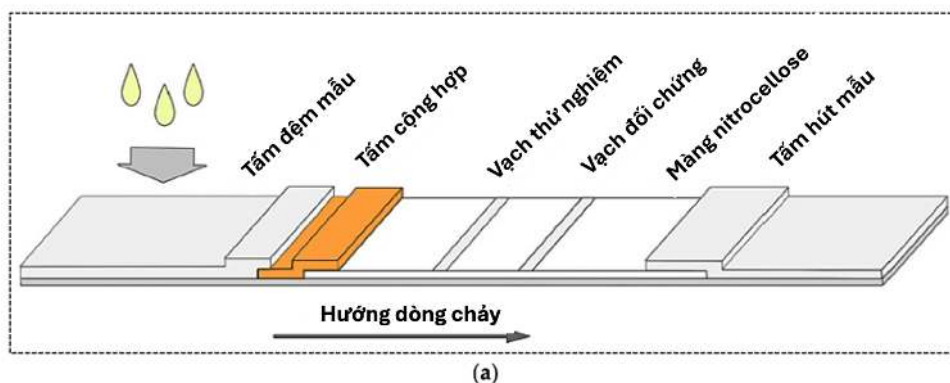
- (1) Sample pad: màng hút mẫu là bộ phận đầu tiên của que thử nhanh, có chức năng tiếp nhận mẫu và phân phối đều mẫu lên toàn bộ bề mặt màng nitrocellulose thông qua cơ chế mao dẫn. Vật liệu thường sử dụng là sợi thủy tinh hoặc cellulose đã được xử lý hóa học nhằm loại bỏ tạp chất, điều chỉnh pH, và bổ sung chất đệm hoặc protein chặn (blocking agents) để giảm hiện tượng gắn kết không đặc hiệu. Đặc điểm quan trọng của màng hút mẫu là khả năng lọc loại bỏ cặn, tế bào hoặc thành phần gây nhiễu, đồng thời điều hòa tốc độ dòng chảy nhằm đảm bảo mẫu đi qua conjugate pad và màng nitrocellulose một cách ổn định. Trong sản xuất, màng hút mẫu thường có độ dày từ 0,5–1 mm, chiều dài 10–15 mm và được gắn chồng lên đầu conjugate pad để tạo sự tiếp xúc liên tục, giữ vai trò then chốt trong việc đảm bảo độ chính xác và độ lặp lại của xét nghiệm.. Một chức năng khác của miếng đệm mẫu trong một số xét nghiệm sử dụng mẫu máu là để thực hiện xử lý trước mẫu như tách các tế bào hồng cầu từ nền mẫu;
- (2) Conjugate pad: được gọi là tấm cộng hợp nằm ngay sau màng hút mẫu và chứa các hạt liên hợp đã được làm khô, thường là hạt nano vàng, hạt latex hoặc hạt từ tính gắn kháng thể, aptamer hay kháng nguyên. Khi mẫu di chuyển qua, dung dịch sẽ tái hòa tan các hạt liên hợp này và đưa chúng theo dòng chảy đến màng nitrocellulose, nơi diễn ra phản ứng đặc hiệu với vạch T và vạch C. Vật liệu làm conjugate pad thường là sợi thủy tinh hoặc polyester xốp, có khả năng giữ và bảo vệ hạt liên hợp trong trạng thái khô ổn định, đồng thời giải phóng nhanh và hoàn toàn khi tiếp xúc với mẫu. Kích thước điển hình của conjugate pad dài 8–

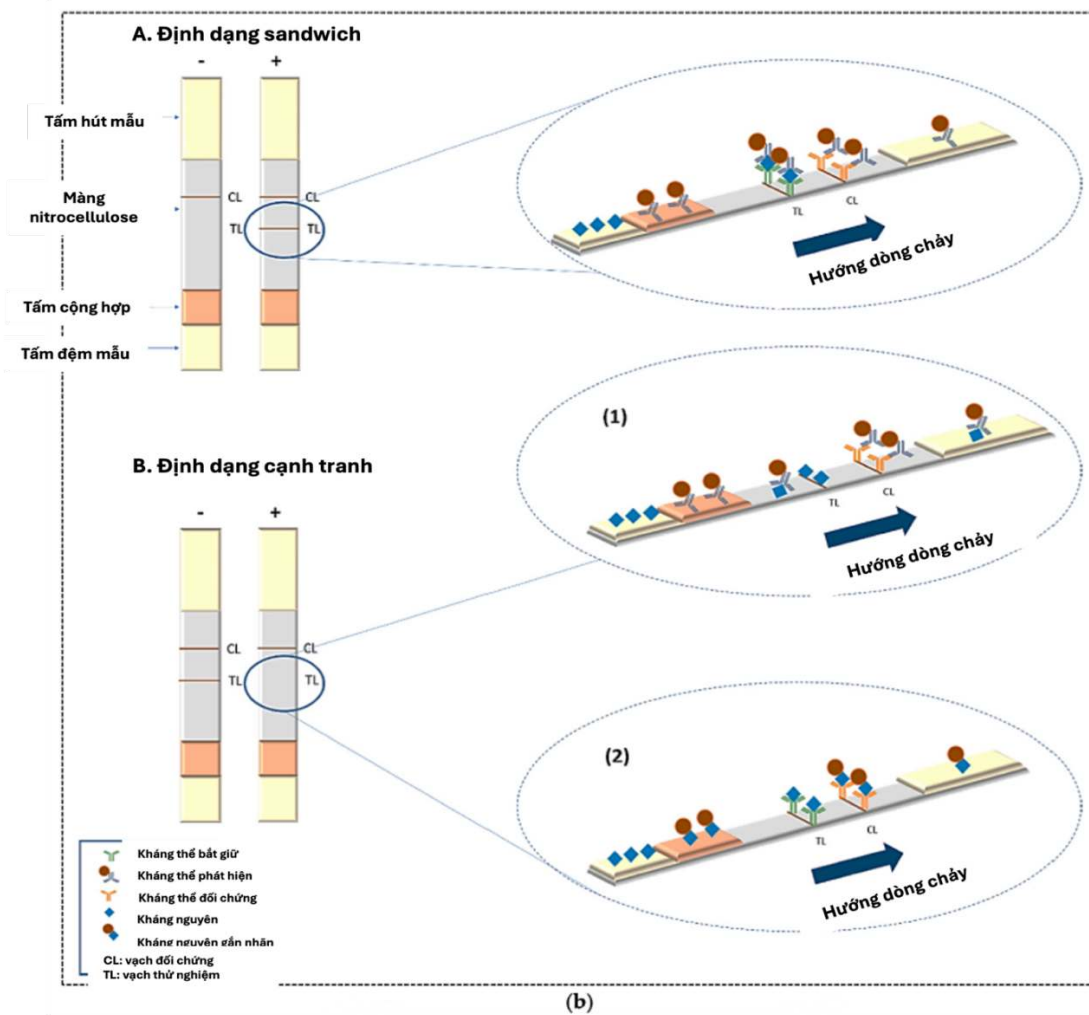
12 mm, rộng tương ứng với màng nitrocellulose, và thường được xử lý thêm bằng dung dịch bảo quản (đường, chất ổn định) để duy trì hoạt tính sinh học của tác nhân nhận biết. Chất lượng và hiệu quả của conjugate pad ảnh hưởng trực tiếp đến cường độ và độ rõ của vạch tín hiệu, do đó là một trong những thành phần quan trọng nhất quyết định độ nhạy của que thử;

- (3) Màng nitrocellulose (NC): Màng nitrocellulose là thành phần trung tâm của que thử nhanh, đóng vai trò là nền tảng để cố định vạch thử (T line) và vạch chứng (C line), đồng thời duy trì sự di chuyển mao dẫn của mẫu từ vùng nạp đến khu vực đọc kết quả. Vật liệu nitrocellulose có cấu trúc xốp, mang điện tích âm nhẹ, với kích thước lỗ trung bình khoảng 8–15 μm và tốc độ mao dẫn điển hình 90–180 giây/4 cm, cho phép kiểm soát tốc độ dòng chảy và ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy cũng như độ sắc nét của tín hiệu. Màng có khả năng gắn protein cao, thường đạt 100–200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, đảm bảo việc cố định ổn định các phân tử sinh học như kháng thể hoặc aptamer mà vẫn duy trì được hoạt tính của chúng. Trong sản xuất, màng nitrocellulose thường có độ dày khoảng 100–150 μm , được dán cố định trên nền nhựa (plastic backing) với chiều rộng 20–30 mm trước khi cắt thành các dải nhỏ 3–5 mm để lắp vào cấu trúc que thử. Các đặc tính này giúp màng nitrocellulose trở thành nền tảng lý tưởng cho các xét nghiệm dòng chảy bên, quyết định chất lượng, độ nhạy và độ đặc hiệu của sản phẩm;
- (4) Absorbent pad: được gọi là màng hấp thụ mẫu và là bộ phận cuối cùng trong cấu trúc que thử nhanh, có chức năng duy trì sự di chuyển liên tục của dung dịch thông qua cơ chế mao dẫn và đóng vai trò như “bơm hút” để kéo toàn bộ mẫu đi qua vùng phản ứng. Vật liệu thường được sử dụng cho màng hấp thụ mẫu là cellulose hoặc sợi tổng hợp có độ xốp cao, khả năng hút dịch mạnh và ổn định trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Miếng thấm được thiết kế với khả năng giữ lượng dịch gấp nhiều lần khối lượng của nó, giúp đảm bảo dung dịch không bị tràn ngược hoặc dừng lại giữa dòng chảy. Trong sản xuất, màng hấp thụ mẫu thường có chiều dài 20–30 mm, chiều rộng tương đương với màng nitrocellulose, và được gắn chồng lên phần cuối của màng nhằm tạo tiếp xúc tốt để duy trì dòng chảy liên tục. Đặc tính quan trọng của miếng thấm là khả năng hấp thụ nhanh và triệt để, góp phần quyết định sự ổn định của dòng chảy, độ rõ ràng của vạch kết quả, đồng thời giúp loại bỏ lượng mẫu dư thừa, từ đó nâng cao độ chính xác và độ tin cậy của phép thử [73].

Trên **Hình 1.12A** mô tả cụ thể cấu tạo của que thử nhanh và **hình 1.12B** mô tả sơ đồ cấu tạo nguyên lý phổ biến của LFIA ở định dạng sandwich và định dạng cạnh tranh. Định dạng sandwich được sử dụng cho các chất phân tích lớn có nhiều vị trí

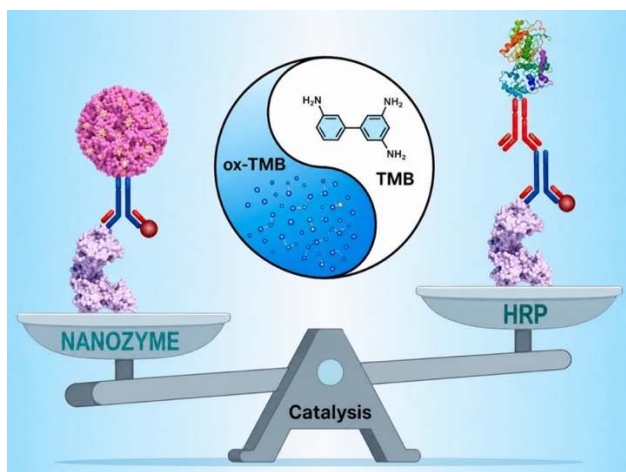
kháng nguyên như vi khuẩn, hormone (ví dụ: human chrionic gonadotropin) và một số chỉ dấu sinh học. Ở dạng này, kháng thể sơ cấp kháng kháng nguyên được phun lên dòng thử nghiệm. Một kháng thể thứ cấp kháng một epitope khác của cùng một kháng nguyên được dán nhãn với các hạt nano và được cố định trên tấm cộng hợp. Kháng thể đặc trưng kháng globulin miễn dịch được phun lên vạch đối chứng và có thể tương tác với kháng thể thứ cấp. Trên thực tế, ở dạng sandwich, mục tiêu được cố định giữa hai kháng thể bổ sung (tức là kháng thể sơ cấp và thứ cấp) trên vạch xét nghiệm. Trong định dạng này, việc tạo tín hiệu trong dòng thử nghiệm (test line) cho thấy kết quả dương tính [73]. Để đánh giá các phân tử nhỏ có trọng lượng phân tử thấp và chỉ có một điểm quyết định kháng nguyên, xét nghiệm cạnh tranh được sử dụng. Vì các phân tử nhỏ không thể liên kết đồng thời với hai kháng thể, thường chỉ sử dụng hai kháng thể khác nhau trong định dạng này. Có hai loại xét nghiệm cạnh tranh. Ở loại đầu tiên, một kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên được liên hợp với nhãn và cố định trên tấm đệm cộng hợp và một kháng thể khác là kháng globulin miễn dịch đặc hiệu được phun lên vạch đối chứng và phản ứng với các hạt thuốc thử. Ở dạng này, phân tử kháng nguyên (nói chung là liên hợp albumin huyết thanh bò (BSA)) được làm khô trên vạch thử trên màng nitrocellulose. Trong trường hợp này, một phản ứng cạnh tranh xảy ra giữa chất phân tích trong mẫu và chất phân tích-BSA trong dòng xét nghiệm để liên kết với kháng thể được đánh dấu. Do đó, kết quả dương tính là thiếu tín hiệu trong vạch thử [75]. Trong loại thứ hai, kháng thể đặc hiệu kháng kháng nguyên được cố định trên vạch thử và kháng nguyên được dán nhãn cố định (chất phân tích được dán nhãn-BSA) trên tấm liên hợp được sử dụng để phát hiện. Vì vậy, xảy ra phản ứng cạnh tranh giữa chất phân tích trong mẫu và kháng nguyên được đánh dấu trong dòng xét nghiệm để liên kết với kháng thể đặc hiệu trên vạch thử nghiệm. Kết quả tương tự như xét nghiệm cạnh tranh đầu tiên (**Hình 1.12B**).





Hình 1.12. (A) Cấu tạo nguyên lý của que thử nhanh LFIA thông thường [73]; (B) Cấu tạo nguyên lý của định dạng sandwich và định dạng cạnh tranh phổ biến của LFIA [76]

LFIA có thể sử dụng các vật liệu khác nhau để dán nhãn kháng thể như hạt latex [77], hạt nano [78], hạt nano bạc [79], liposome chứa thuốc nhuộm [80], hạt nano vàng (AuNP) [74], hạt nano silica chứa chelate europium [81], chấm lượng tử [82]. Mỗi nhãn có thể tạo ra những đặc điểm khác nhau trong nền tảng chẩn đoán, nhưng mục đích chính của việc sử dụng các nhãn khác nhau là cố gắng tạo ra nhiều xét nghiệm với độ nhạy và độ chọn lọc cao. Tuy nhiên, trong số đó AuNP vẫn được sử dụng rộng rãi nhất và được sử dụng nhiều nhất do tính chất quang học độc đáo của chúng, mang lại cho chúng khả năng tạo ra tín hiệu màu có thể quan sát được bằng mắt thường, độ ổn định cao ở dạng lỏng hoặc khô và khả năng liên hợp dễ dàng với các vật liệu sinh học. Ngoài kháng thể, nhiều yếu tố nhận biết khác như aptamer cũng có thể được sử dụng để phát triển LFIA. Kháng thể là tác nhân nhận biết sinh học đầu tiên và phổ biến nhất trong LFIA; tuy nhiên, trong những năm gần đây, aptamer đã nổi lên như một giải pháp thay thế khả thi nhờ những ưu điểm tiềm năng của chúng trong nhiều phương pháp chẩn đoán, bao gồm cả LFIA.



Hình 1.13. Ứng dụng nanozyme trong ELISA thay thế enzyme HRP [83]

Các xét nghiệm miễn dịch truyền thống (immunoassays) thường sử dụng enzyme đánh dấu là peroxidase, chẳng hạn như horseradish peroxidase (HRP) [84]. Tuy nhiên, các hạn chế vốn có của enzyme sinh học này — như chi phí cao và độ ổn định kém — đã giới hạn khả năng cải thiện thêm hiệu suất của kỹ thuật ELISA. Ngoài ra, trong các xét nghiệm ELISA truyền thống, phức hợp enzyme–kháng thể thường được liên kết cộng hóa trị giữa enzyme và kháng thể. Quá trình này đòi hỏi các bước chuẩn bị và tinh sạch phức tạp, dẫn đến suy giảm hoạt tính xúc tác của enzyme cũng như hiệu quả gắn kết của kháng thể với kháng nguyên, từ đó làm giảm độ nhạy của ELISA. Gần đây, các nanoenzyme (nanozymes), với những ưu điểm nổi bật như giá thành thấp, dễ dàng biến đổi bề mặt, và độ ổn định cao, đã thu hút sự quan tâm ngày càng lớn trong nghiên cứu và phát triển các hệ thống xét nghiệm miễn dịch thế hệ mới (**Hình 1.13**). Trong một nghiên cứu ứng dụng hạt nano trong ELISA phát hiện norfloxacin trong sữa, các hạt nano xanh Phổ (Prussian blue nanoparticles – PBNPs) là một loại nanoenzyme phổ biến với khả năng hấp thụ ánh sáng mạnh. Nhờ vào độ ổn định cao, tính linh hoạt trong quá trình tổng hợp, và hiệu ứng quang – nhiệt vượt trội, vật liệu này đã được ứng dụng rộng rãi trong các cảm biến, điện hóa, liệu pháp sinh học và hình ảnh sinh học [85]. PBNPs được cấu tạo từ polyme phối trí có công thức $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, thể hiện hoạt tính tương tự peroxidase, đặc tính có thể được khai thác để thay thế enzyme tự nhiên trong kỹ thuật ELISA. Bên cạnh đó, dung dịch PBNPs có màu xanh lam cho thấy hoạt tính giống peroxidase cao, có khả năng xúc tác sự phân hủy hydrogen peroxide (H_2O_2) và oxy hóa chất nền 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), tạo ra sản phẩm có màu xanh lam với hiệu suất cao. Nano-ELISA cho thấy hiệu quả chẩn đoán vượt trội so với phương pháp Sandwich ELISA truyền thống, thể hiện qua độ nhạy cao hơn (96,77% so với 77,42%), độ đặc hiệu cao hơn (93,75% so với 75%), và giá trị tiên đoán dương (PPV) cũng lớn hơn (96,77% so với 85,71%) đã được chứng minh trong nghiên cứu ứng dụng hạt nano

vàng phát triển nano-ELISA phát hiện kháng nguyên nang sán [86]. Các hạt nano vàng (gold nanoparticles – AuNPs) sử dụng trong hệ thống ELISA thường mang nhiều hoạt tính enzyme trên mỗi phân tử kháng thể, nhờ đó tạo ra tín hiệu đo màu mạnh hơn đáng kể, cho phép phát hiện các mẫu có nồng độ phân tích rất thấp [87]. Hơn nữa, AuNPs có diện tích bề mặt riêng lớn, tính ổn định cao, và khả năng liên hợp dễ dàng với các phân tử sinh học như kháng thể, aptamer hoặc enzyme. Những đặc tính này giúp tăng mật độ gắn kết giữa enzyme và kháng thể, cải thiện hiệu suất xúc tác phản ứng màu, và giảm nhiễu nền, từ đó nâng cao độ nhạy và độ chính xác của phép đo ELISA. Vì vậy, nano-ELISA hay ELISA trực tiếp dựa trên hạt nano vàng được xem là hướng phát triển tiềm năng trong các kỹ thuật xét nghiệm nhanh với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

1.5. Phương pháp kết hợp aptamer - kháng thể và ứng dụng hạt nano vàng trong thiết kế cảm biến sinh học

Hạt nano vàng (AuNPs) sở hữu nhiều đặc tính lý hóa độc đáo nhờ kích thước nano đặc trưng. Các đặc tính nổi bật của AuNPs bao gồm khả năng quang học vượt trội, tính tương thích sinh học cao và hoạt tính xúc tác tốt. Trong số đó, hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance – SPR) là tính chất quang học được ứng dụng phổ biến nhất của AuNPs trong lĩnh vực công nghệ sinh học nano [88]. Nhờ các đặc tính này, AuNPs được ứng dụng như một nền tảng cảm biến trong phát hiện các tác nhân gây bệnh nguy hiểm do vi khuẩn và virus gây ra. Cơ chế phát hiện của các cảm biến sinh học dựa trên AuNPs được cấu thành từ ba thành phần cơ bản, bao gồm: (i) bộ phận nhận diện sinh học được cố định trên bề mặt AuNPs như aptamer, kháng thể, enzyme hoặc acid nucleic; (ii) bộ chuyển đổi tín hiệu (transducer) có chức năng chuyển đổi tín hiệu sinh học thành tín hiệu điện tử và truyền tín hiệu; và (iii) chất phân tích (analyte), chính là phân tử đích cần phát hiện. Khi phân tử đích tiếp xúc với thành phần nhận diện sinh học, sự liên kết đặc hiệu sẽ xảy ra giữa phân tử đích và thụ thể sinh học. Sau đó, bộ chuyển đổi tín hiệu sẽ chuyển các tín hiệu sinh học thành tín hiệu có thể đo lường được, và kết quả được hiển thị trên hệ thống đọc tín hiệu tương ứng. Nhờ khả năng khuếch đại tín hiệu của AuNPs, các cảm biến sinh học có thể phát hiện tác nhân gây bệnh ở nồng độ rất thấp [89].

Để khai thác các đặc tính quang học và xúc tác của AuNPs trong phát hiện sinh học, cần kết hợp vật liệu nano với các phân tử nhận biết có khả năng tương tác đặc hiệu với target, trong đó kháng thể là một trong những thụ thể sinh học được sử dụng phổ biến. Kháng thể đóng vai trò then chốt trong các xét nghiệm miễn dịch; tuy nhiên, chúng tồn tại một số hạn chế nhất định. Các hạn chế này bao gồm sự phụ thuộc vào động vật thí nghiệm trong quá trình tạo kháng thể, yêu cầu nghiêm ngặt về điều kiện

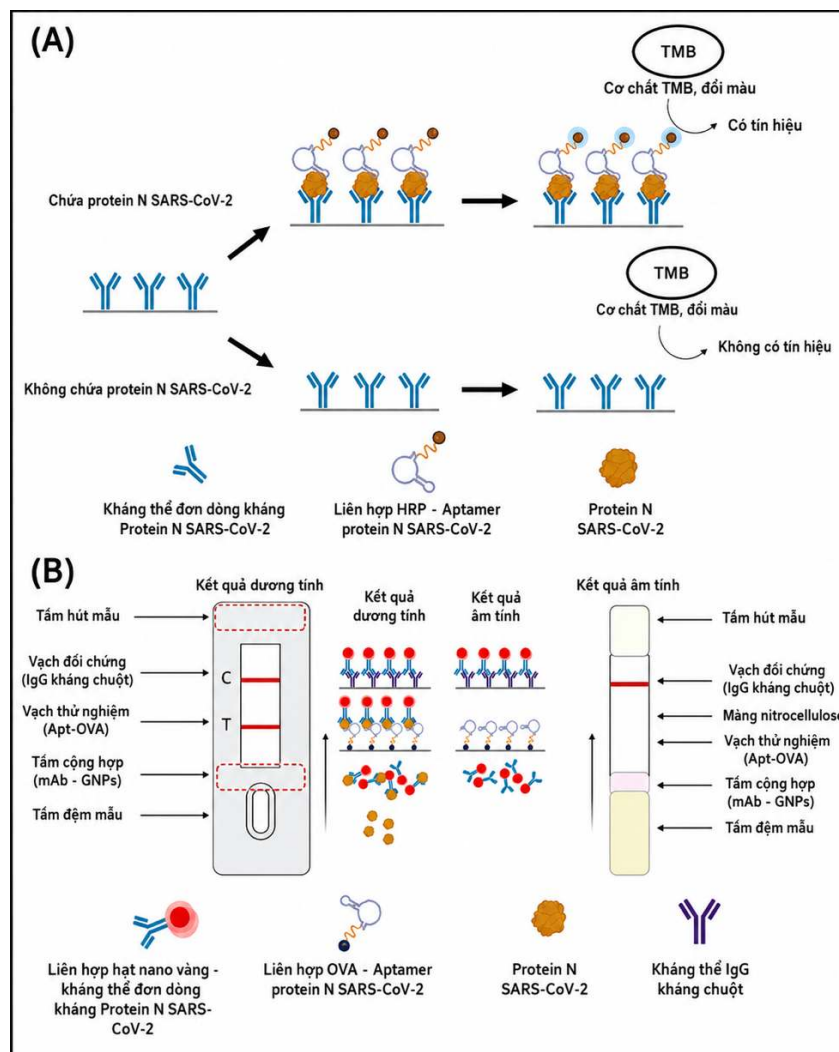
vô trùng, nhu cầu nhân lực có trình độ chuyên môn cao, cũng như khả năng dung nạp hạn chế đối với các cấu hình kháng nguyên. Những yếu tố này dẫn đến quy trình sản xuất kéo dài và chi phí cao. Do đó, các aptamer oligonucleotide được phát triển như một giải pháp thay thế đầy triển vọng trong chế tạo các xét nghiệm dựa trên aptamer. Aptamer có khả năng gấp cuộn tạo thành cấu trúc không gian ba chiều đặc thù, cho phép chúng nhận diện và liên kết đặc hiệu với các mục tiêu sinh học với ái lực cao, do đó aptamer thường được gọi là “kháng thể hóa học”. So với kháng thể, aptamer sở hữu nhiều ưu điểm vượt trội. Chúng có thể được sàng lọc *in vitro*, dễ dàng liên hợp với nhiều loại phân tử khác nhau, không gây đáp ứng miễn dịch, dễ tổng hợp bằng phương pháp hóa học và có độ biến thiên giữa các lô sản xuất rất thấp. Các xét nghiệm dựa trên aptamer hiện đang thu hút nhiều sự quan tâm như một công cụ chẩn đoán đầy tiềm năng [90]. Kháng thể và aptamer sở hữu những đặc tính riêng biệt, có tính bổ trợ lẫn nhau trong nhiều ứng dụng phân tích. Nhằm khai thác các đặc tính bổ sung này cũng như khắc phục những hạn chế vốn có của từng loại phân tử sinh học, các phương pháp phân tích lai aptamer–kháng thể đã được phát triển. Cách tiếp cận đổi mới này giúp nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu của phép phân tích, đồng thời cho phép phát hiện đồng thời nhiều mục tiêu khác nhau [91]. Trong các hệ thống này, kháng thể hoặc aptamer được cố định trên một giá mang rắn, sau đó mẫu chứa các phân tử mục tiêu được đưa vào. Các kháng thể hoặc aptamer sẽ bắt giữ chọn lọc các phân tử mục tiêu, và chúng được phát hiện thông qua các kháng thể hoặc aptamer có gắn nhãn, có khả năng nhận diện đặc hiệu các mục tiêu đã được bắt giữ. Một nghiên cứu ứng dụng các aptamer oligonucleotide và kháng thể đơn dòng đặc hiệu với protein nucleocapsid (N) tái tổ hợp của SARS-CoV-2 phát triển thành công hai kỹ thuật phát hiện mới có độ nhạy rất cao nhằm nhận diện nhanh protein N của SARS-CoV-2 trong các mẫu dịch tỵ hầu, bao gồm xét nghiệm sandwich aptamer–kháng thể liên kết enzyme (enzyme-linked aptamer–antibody sandwich assay, ELAAA) và que thử dòng chảy bên lai (hybrid lateral flow strip, hybrid-LFS). Phương pháp ELAAA cho thấy giới hạn phát hiện ấn tượng ở mức 0,1 ng/mL, trong khi hybrid-LFS đạt dải phát hiện từ 0,1 đến 0,5 ng/mL. Trong quá trình đánh giá trên mười mẫu dịch tỵ hầu được bổ sung các nồng độ protein N đã biết, ELAAA đạt tỷ lệ thu hồi trung bình là 92%. Bên cạnh đó, khi thử nghiệm trên năm mẫu dịch tỵ hầu của bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2 và mười mẫu từ người tình nguyện khỏe mạnh, hybrid-LFS thể hiện độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao [92]. Nguyên lý của hai kỹ thuật lai ELAAA và LFS được trình bày chi tiết trên **Hình 1.14**. Từ đó, chiến lược lai aptamer–kháng thể đơn dòng (Apt–mAb) đáng tin cậy không chỉ góp phần nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu của các phương pháp chẩn đoán virus mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng trong việc

kiểm soát sự lây lan của các bệnh truyền nhiễm liên quan. Một nghiên cứu khác phát triển thành công cảm biến điện hóa sử dụng cấu trúc sandwich lai kháng thể–aptamer để phát hiện thrombin trong huyết thanh người. Cảm biến cho phép chuyển điện từ trực tiếp (Direct Electron Transfer – DET) diễn ra nhanh chóng thông qua cấu trúc sandwich kháng thể–aptamer lai, bao gồm: (i) đầu dò bắt giữ là kháng thể, cung cấp ái lực cao và độ đặc hiệu đối với mục tiêu trong huyết thanh người; (ii) mục tiêu thrombin; và (iii) đầu dò phát hiện là aptamer, cho phép liên hợp thuận tiện ở đầu tận cùng với DNA mạch nối dài, linh hoạt và peptide polylinker chứa nhiều nhân oxi-hóa khử phenazine ethosulfate phản ứng với amin (arPES), giúp các nhân liên hợp dễ dàng tiếp cận bề mặt điện cực. Quá trình DET lặp lại nhanh chóng thông qua phản ứng oxy hóa NADH được xúc tác bởi arPES đã làm tăng cường đáng kể tín hiệu điện hóa. Kích thước phù hợp của mạch nối và polylinker giúp giảm sự hấp phụ không đặc hiệu của đầu dò aptamer liên hợp với nhiều arPES, đồng thời hạn chế sự cản trở đối với khả năng liên kết của aptamer. Các phương pháp cố định kháng thể có đầu thiol trên điện cực vàng (Au) đã được so sánh và tối ưu hóa [93].

Mặc dù các hệ lai hoặc các phép thử dạng sandwich có cấu trúc phức tạp hơn và đòi hỏi nhiều bước để quá trình phát hiện diễn ra, việc sử dụng các hệ này cho thấy hiệu suất phân tích vượt trội so với các nền tảng cảm biến sinh học khác. Một nghiên cứu đánh giá hiệu suất phân tích của các cấu trúc khác nhau của cảm biến sinh học SPR trong phát hiện protein (protein phản ứng C) đã báo cáo rằng, trên nền tảng tăng cường bằng hạt nano vàng, giới hạn phát hiện đạt được lần lượt là 1 nM đối với cảm biến sinh học dạng chuẩn và 10 pM đối với cảm biến sinh học dạng hệ lai [94]. Các nền tảng cảm biến sinh học song chế độ tương tự đã được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu nhằm phát hiện các yếu tố đông máu [95], thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì người, và các dấu ấn sinh học của bệnh Alzheimer [96], cùng với nhiều yếu tố nhận biết sinh học khác. Những thách thức khi sử dụng aptamer để nhận biết các phân tử mục tiêu có khối lượng phân tử nhỏ bao gồm độ phức tạp cấu trúc thấp đối với các phân tử có khối lượng dưới 1 kDa, số lượng nhóm chức khả dụng cho quá trình liên hợp hạn chế do diện tích bề mặt nhỏ, cũng như tương tác liên kết yếu. Bên cạnh đó, số lượng nhóm chức hạn chế trong các phân tử nhỏ làm giảm khả năng liên hợp giữa aptamer và phân tử mục tiêu. Tương tự, mặc dù kháng thể có thể phát hiện các phân tử mục tiêu có kích thước nhỏ, nhưng khó khăn trong việc tạo ra các cặp kháng thể phù hợp có thể dẫn đến độ đặc hiệu và độ nhạy thấp của phép thử, đồng thời đòi hỏi quy trình xử lý mẫu phức tạp khi phát hiện các phân tử mục tiêu nhỏ.

Từ tổng quan các nghiên cứu cho thấy rằng, mặc dù các phương pháp truyền thống như nuôi cấy, xét nghiệm sinh hóa hay miễn dịch dựa trên enzyme đã được sử

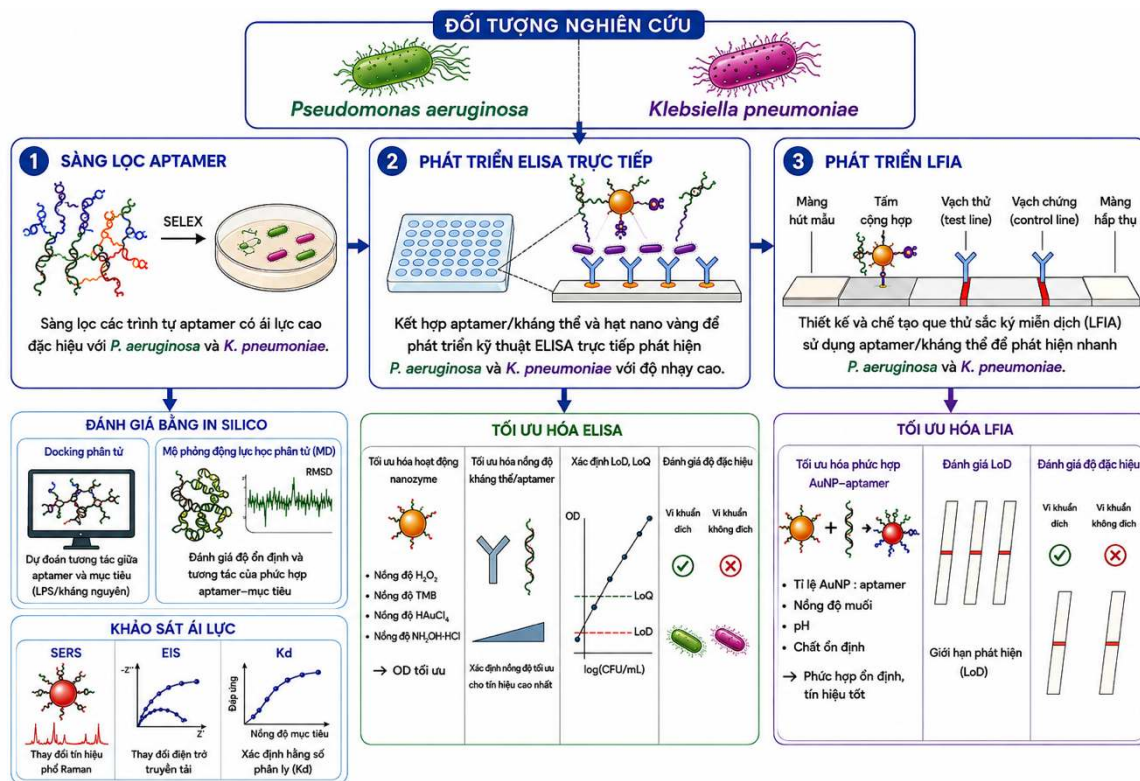
dụng rộng rãi trong phát hiện vi khuẩn gây bệnh, song chúng vẫn tồn tại nhiều hạn chế như thời gian phân tích dài, độ nhạy và đặc hiệu chưa cao, chi phí lớn, và tính ổn định của kháng thể kém. Trong bối cảnh sự gia tăng của các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc, đặc biệt là *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae*, nhu cầu về một phương pháp phát hiện nhanh, chính xác, ổn định và chi phí thấp là hết sức cấp thiết. Những tiến bộ gần đây trong công nghệ aptamer đã mở ra hướng tiếp cận mới, khi các phân tử này có thể được lựa chọn sử dụng như một đầu thu sinh học nhờ độ đặc hiệu cao, khả năng tổng hợp nhanh, dễ biến tính và bảo quản. Đặc biệt, việc kết hợp aptamer-kháng thể với kỹ thuật sắc ký miễn dịch và ELISA trực tiếp ứng dụng hạt nano vàng có tiềm năng tạo ra nền tảng chẩn đoán sinh học thế hệ mới, phù hợp cho phát hiện nhanh vi khuẩn tại chỗ (POCT) trong thời gian ngắn. Từ cơ sở đó, luận án này được thực hiện với mục tiêu chọn lọc aptamer đặc hiệu cho vi khuẩn *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae*, đồng thời phát triển hệ thống phát hiện dựa trên kỹ thuật sắc ký miễn dịch và ELISA trực tiếp có độ nhạy cao, ổn định và dễ ứng dụng trong thực tiễn chẩn đoán vi sinh.



Hình 1.14. Cấu tạo nguyên lý của kỹ thuật lai ELAAA và LFS [92]

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Chương này tập trung trình bày chi tiết về các đối tượng nghiên cứu, nguyên liệu, hóa chất và quy trình thực nghiệm được sử dụng trong luận án. Mục tiêu trọng tâm của chương là thiết lập một quy trình khoa học chuẩn xác, từ việc chuẩn bị các chủng vi khuẩn mục tiêu *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae*, cho đến kỹ thuật chọn lọc aptamer đặc hiệu thông qua quy trình SELEX cải tiến. Bên cạnh đó, các phương pháp chế tạo hạt nano vàng (AuNPs) và kỹ thuật tích hợp đầu dò aptamer và kháng thể lên nền tảng sắc ký miễn dịch (LFIA) cũng như Nano-ELISA sẽ được mô tả cụ thể. Đây chính là khung phương pháp luận quan trọng, đảm bảo tính khách quan và khả năng lặp lại của các kết quả thực nghiệm, làm tiền đề cho việc đánh giá hiệu năng phát hiện trong các nội dung tiếp theo của nghiên cứu. Sơ đồ tổng quan nghiên cứu được mô tả chi tiết trong **hình 2.1**.



Hình 2.1. Sơ đồ tổng quan nghiên cứu của luận án

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

2.1.1. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Địa điểm: Phòng Công nghệ Tích hợp dựa trên IT-BT, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam – Hàn Quốc

Thời gian: từ tháng 11 năm 2022 đến tháng 12 năm 2025

2.1.2. Vật liệu

Bảng 2.1. Các loài vi khuẩn được sử dụng trong luận án

Tên vi khuẩn	Mã	Nguồn cung cấp
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VTCC 12273	Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (Vietnam Type Culture Collection - VTCC), Viện Vi sinh vật và công nghệ sinh học
<i>K.pneumoniae</i>	VTCC 12018	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Kwik-Stik, Microbiologics Inc., Hoa Kỳ
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12915	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 11632	
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	

Các chủng vi khuẩn này được nuôi cấy ở 37⁰C trong môi trường BHI broth cho đến khi đạt mật độ quang học (OD) tại bước sóng 600 nm là 0,8, tương ứng với 10⁹ CFU/mL.

Các hóa chất sử dụng

Bảng 2.2. Các loại kháng nguyên, kháng thể được sử dụng trong luận án

Tên kháng nguyên, kháng thể	Mã sản phẩm	Nhà cung cấp	Đặc điểm
Lipopolysaccharides (LPS) từ <i>K.pneumoniae</i>	L4268-10MG	Sigma - Aldrich	LPS có nguồn gốc từ <i>K.pneumoniae</i> ATCC 15380 thuộc typ huyết thanh K1, kháng nguyên O1
Kháng thể Rabbit anti- <i>K.pneumoniae</i> polyclonal	PA1-7226	Invitrogen	Kháng thể có khả năng nhận diện nhiều loại kháng nguyên khác nhau của vi khuẩn <i>Klebsiella</i>
Kháng thể Rabbit anti- <i>Pseudomonas</i> polyclonal	PA1-73116	Invitrogen	Kháng thể được sản xuất/chọn lọc dựa trên kháng nguyên là tế bào nguyên vẹn của <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chủng ATCC 27853

Kháng thể Mouse anti-Rabbit IgG	31213	Invitrogen	Các kháng thể đã được tinh sạch bằng phương pháp ái lực, có tính đặc hiệu đã được đặc trưng rõ ràng đối với các immunoglobulin của thỏ
Kháng thể Goat anti-Mouse IgG	31160	Invitrogen	Các kháng thể đã được tinh sạch bằng phương pháp ái lực, có tính đặc hiệu đã được đặc trưng rõ ràng đối với các immunoglobulin của chuột

Bảng 2.3. Các loại trình tự, môi được sử dụng trong luận án

Tên	Trình tự	Mục đích sử dụng
Thư viện ngẫu nhiên	5'- ATCCGTCACACCTGCTCT - N55 - TGGTGGTGGCTCCCGTAT- 3'	Thư viện sử dụng cho vòng chọn lọc đầu tiên
Môi biotin	5'- biotin – ATACGGGAGCCAACACCA - 3'	Cặp môi tham gia phản ứng PCR đối xứng và PCR bất đối xứng trong quá trình SELEX
Môi FAM	5'- FAM – ATC CGT CAC ACC TGC TCT - 3'	
Môi xuôi không chỉnh sửa	5'- ATACGGGAGCCAACACCA - 3'	Cặp môi tham gia giải trình tự
Môi ngược không chỉnh sửa	5'- ATC CGT CAC ACC TGC TCT - 3'	

- Các nguyên liệu và hóa chất được sử dụng trong quá trình chọn lọc bao gồm: Thư viện ngẫu nhiên, môi biotin, môi FAM- được đặt tổng hợp từ Integrated DNA Technologies, California, Hoa Kỳ (**Bảng 2.3**). Dynabeads M-280 Streptavidin (Thermo Scientific, USA), đệm carbonate pH 9.5: 1.05 g NaHCO₃ và 9.274 g Na₂CO₃ (Anhydrous) trong 1L nước deion, BSA (Sigma-Aldrich), binding buffer: 20 nmol/L HEPES pH 7,4, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂, 120 mmol/L KCl, đệm rửa: binding buffer chứa 0.05% Tween-20, dung dịch rửa giải: 20 mmol/L Tris-HCl pH 8,3 chứa 4 mol/L guanidinium isothiocyanate và 1 mmol/L DTT, Sodium acetate (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), 100% EtOH (Sigma-Aldrich), 2-propanol (Sigma-Aldrich), Dream Tag HotStart PCR Master mix (2X) (Thermo Scientific, USA), 10X TBE: 54 g Tris Base + 22.5 g Boric

Acid + 20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 30% polyacrylamide, TEMED (Sigma-Aldrich), Amonium Persulfate - APF (Sigma-Aldrich), Top Vision Agarose (Thermo Fisher Scientific, USA), thuốc nhuộm gel: Redsafe (INTRON), GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA), 6X DNA loading dye (Thermo Scientific, USA), GeneJET Purification Kit (Thermo Scientific, USA), 2 × B&W buffer: 10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, sodium hydroxide (Sigma-Aldrich), LB broth (Miller) (Sigma-Aldrich), LB agar (Miller) (Sigma-Aldrich), Kanamycin sulfate (Gibco), TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli (Thermo Scientific, USA), GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Scientific, USA), nước không chứa DNase/ RNase và nuclease (Invitrogen).

- Hóa chất chế tạo hạt nano vàng: Gold (III) chloride trihydrate (HAuCl_4), trisodium citrate dihydrate, nước cất.
- Vật liệu và hóa chất phát triển que thử sắc kí miễn dịch: màng hút mẫu, tấm cộng hợp, màng nitrocellulose, màng hấp thụ mẫu. Dung dịch đệm: HEPES 1X pH 7.4, PBS 1X pH 7.4, MES 1X pH 6.0, Borate 1X pH 10.8. Các thành phần của đệm: Tween-20, sucrose, bovine serum albumin (BSA), TCEP, DATP.
- Hóa chất phát triển ELISA trực tiếp: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), hydro peroxide (H_2O_2), hydroxylammonium chloride ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$), Gold (III) chloride trihydrate (HAuCl_4).

2.1.3. Thiết bị sử dụng

Danh sách các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê trong **Bảng 2.4**

Bảng 2.4. Các thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên thiết bị	Hãng
1	Máy khuếch đại gen PCR	Bio-Rad
2	Bể điều nhiệt	Firstek
3	Tủ lạnh âm	BioBase
4	Máy đo UV-VIS	Jaco
5	Máy Zetasizer Nanoseries ZS instrument	Anton Paar
6	Máy phun Dispenser and Sprayer Model	Autokun
7	Máy cắt	Autokun
8	Máy li tâm	Hermle
9	Máy vortex	Effendorf
10	Máy rung siêu âm	
11	Máy soi gel	BioBase

12	Tủ an toàn sinh học cấp 2	Biobase
13	Tủ 4 °C	GT Scien
14	Tủ - 20 °C	Haier Biomedical
15	Tủ - 80 °C	EBAC
16	Tủ sấy	LK Lab Korea
17	Bể điện di	Bio-Rad
18	Cân phân tích	A&D Weighing
19	Máy Nanodrop	ThermoScientific, USA

2.2. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho trực khuẩn *K.pneumoniae*

2.2.1. Quá trình chọn lọc SELEX

Thư viện DNA sợi đơn dài 91 nucleotide, bao gồm 55 nucleotide có trình tự ngẫu nhiên (5'-ATCCGTCACACCTGCTCT-N55-TGGTGTTGGCTCCCGTAT-3'), được đặt tổng hợp từ Integrated DNA Technologies (California, Hoa Kỳ). Thư viện DNA này được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng mỗi xuôi có gắn biotin (5'-Biotin-ATC CGT CAC ACC TGC TCT-3') và mỗi ngược được phosphoryl hóa ở đầu 5' (5'-/5Phos/ATA CGG GAG CCA ACA CCA-3'). Cặp mỗi này cũng được sử dụng trong phản ứng PCR bất đối xứng để tạo thư viện cho vòng chọn lọc tiếp theo.

Trong vòng chọn lọc đầu tiên, lipopolysaccharide (LPS) từ *K.pneumoniae* ATCC 15380 (L4268, Sigma – Aldrich, Mỹ) được pha loãng trong đệm carbonate–bicarbonate (pH 9,6) và cố định trên đĩa Costar 96-well EIA/RIA plate qua đêm ở 4°C. Sau đó, các giếng được chặn bằng dung dịch bovine serum albumin (BSA) 3% (w/v) ở 37 °C trong 2 giờ. Thư viện ssDNA 10 mM trong đệm gắn kết (20 mmol/L HEPES, pH 7,35; 1 mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L CaCl₂; 150 mmol/L NaCl) được gia nhiệt ở 95°C trong 5 phút và làm lạnh nhanh trên đá trong 10 phút trước khi ủ. Sau bước chặn, các giếng phủ LPS được rửa ba lần bằng đệm rửa (đệm gắn kết bổ sung 0,05% Tween-20), rồi ủ với hỗn hợp ssDNA ở 37°C trong 1 giờ dưới điều kiện lắc. Các trình tự không gắn kết được loại bỏ thông qua sáu lần rửa. Các phân tử ssDNA gắn đặc hiệu được tách bằng cách thêm nước không chứa nuclease và gia nhiệt ở 95°C trong 15 phút, sau đó được thu hồi và khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 2%. Ở các vòng chọn lọc tiếp theo, quy trình được duy trì với mức độ chọn lọc tăng dần nhằm nâng cao tính đặc hiệu. Từ vòng thứ tư trở đi, bước chọn lọc âm được bổ sung: thư viện ssDNA trước tiên được ủ trong các giếng trắng đã chặn bằng BSA ở 37°C trong 1 giờ dưới điều kiện lắc nhằm loại bỏ các trình tự gắn không đặc hiệu, trước khi tiếp xúc với các giếng đã phủ LPS.

Quá trình tối ưu hóa phản ứng PCR được thực hiện nhằm xác định nhiệt độ bắt cặp, số chu kỳ và nồng độ khuôn tối ưu. Các thành phần tham gia phản ứng được liệt kê trong **bảng 2.5**. Chương trình chu trình nhiệt bao gồm bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là các chu kỳ gồm: 95°C trong 10 giây (biến tính), bắt cặp ở các mức nhiệt độ khác nhau trong 10 giây và kéo dài ở 72°C trong 10 giây; cuối cùng là bước kéo dài hoàn tất ở 72°C trong 3 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 2%. Điều kiện tối ưu được lựa chọn dựa trên tiêu chí tạo ra băng đặc hiệu rõ nét với mức khuếch đại không đặc hiệu thấp nhất.

Sau khi tối ưu, phản ứng PCR quy mô lớn được tiến hành để thu nhận lượng DNA đủ cho quá trình tái tạo ssDNA. Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng thiết bị lọc ly tâm Microcon-30 kDa (màng Ultracel-30) nhằm loại bỏ môi dư thừa.

Bảng 2.5. Các thành phần trong phản ứng PCR cho vòng chọn lọc

Thành phần	Lượng thêm vào cho 1 phản ứng PCR (50 μ L)
2X Hot Start Master Mix	25 μ L
10 μ M môi FAM	1 μ L
10 μ M môi biotin	1 μ L
Khuôn mẫu	1 μ L
Nước	22 μ L

Để thu nhận ssDNA làm thư viện giàu hóa cho vòng chọn lọc tiếp theo, các sản phẩm PCR được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR bất đối xứng (aPCR). Các thông số được tối ưu trong aPCR bao gồm nhiệt độ bắt cặp tối ưu, tỷ lệ môi xuôi/môi ngược, số chu kỳ và nồng độ khuôn. Các thành phần tham gia phản ứng được liệt kê trong **bảng 2.6**. Chương trình chu trình nhiệt được thiết lập như sau: biến tính ban đầu ở 90°C trong 3 phút; tiếp theo là các chu kỳ gồm ba bước, mỗi bước 20 giây (biến tính ở 95°C, bắt cặp ở các mức nhiệt độ khác nhau và kéo dài ở 72°C); cuối cùng là bước kéo dài hoàn tất ở 72°C trong 3 phút. Sản phẩm aPCR được phân tích trên gel agarose 4%, và điều kiện tạo ra băng ssDNA đậm, đặc hiệu, với mức khuếch đại không đặc hiệu tối thiểu được lựa chọn cho các bước tiếp theo.

Bảng 2.6. Các thành phần trong phản ứng PCR bất đối xứng

Thành phần	Lượng thêm vào cho 1 phản ứng PCR (50 μ L)
2X Hot Start Master Mix	25 μ L
50 μ M mỗi FAM	1 μ L
1 μ M mỗi biotin	2,5 μ L
Khuôn mẫu	1 μ L
Nước	20,5 μ L

Trước khi ủ kháng nguyên với ssDNA, dung dịch chứa ssDNA được xác định nồng độ bằng thiết bị NanoDrop (C1). Sau khi kết thúc quá trình ủ kháng nguyên với ssDNA ở mỗi vòng, dung dịch không gắn kháng nguyên được hút ra và thu lại. Các giếng được rửa từ 2 đến 3 lần bằng dung dịch đệm rửa (tất cả các dung dịch rửa được thu lại và gom lại cùng dung dịch chứa ssDNA không gắn kháng nguyên ở trên). Dung dịch này cũng được xác định nồng độ bằng NanoDrop (C2). Tỷ lệ % ssDNA không gắn kháng nguyên sau mỗi vòng chọn lọc được xác định theo công thức $C2 \times 100\% / C1$. Tỷ lệ này cũng giúp phản ánh phần nào tỷ lệ ssDNA gắn kháng nguyên ở mỗi vòng.

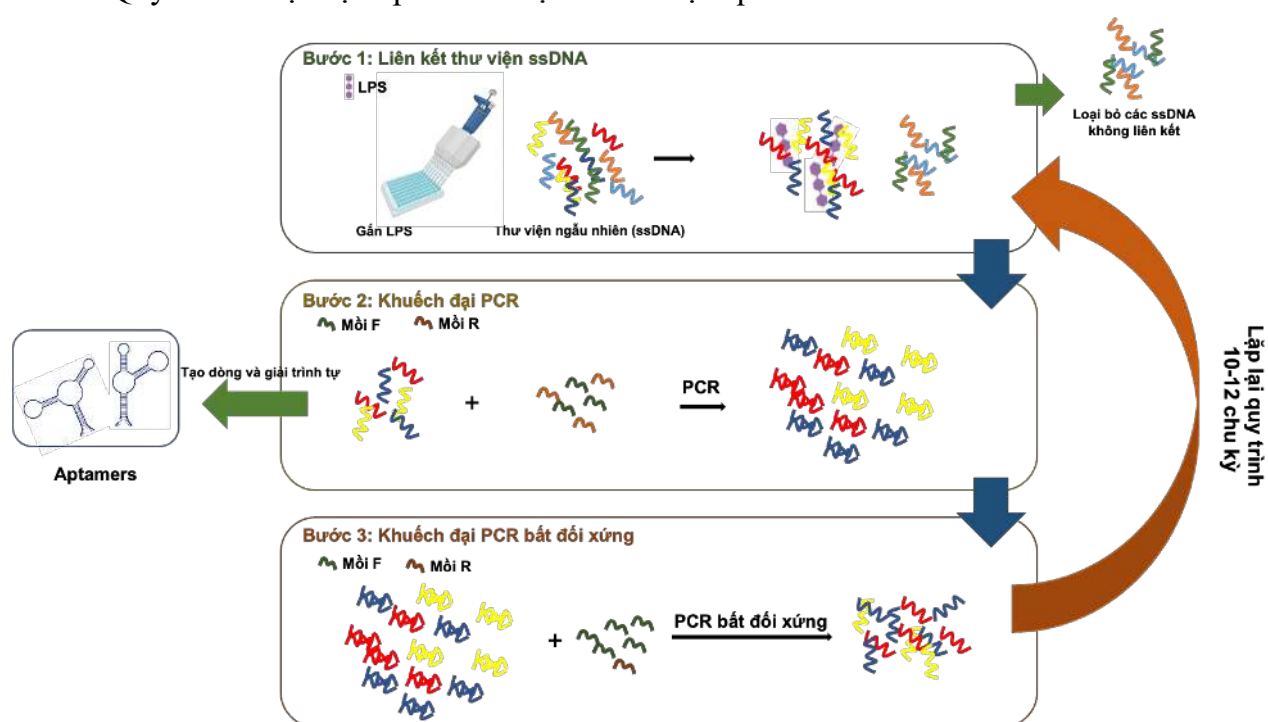
Đồng thời, sau mỗi vòng chọn lọc, dung dịch chứa ssDNA không gắn kháng nguyên, ssDNA gắn BSA (negative selection) và ssDNA gắn kháng nguyên được thu lại và tinh sạch bằng GeneJET gel extraction kit. Các mẫu được rửa giải bằng 30 μ L dung dịch rửa giải trong kit. Sau đó, một lượng thể tích như nhau của các dung dịch trên được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Sản phẩm PCR thu được được kiểm tra trên gel 2% agarose để xác định sự có mặt của ssDNA trong mẫu cũng như so sánh lượng tương đối của ssDNA gắn kháng nguyên so với ssDNA không gắn kháng nguyên và ssDNA gắn BSA.

2.2.2. Xác định các trình tự aptamer tiềm năng

20- 50 ng ssDNA sau quá trình chọn lọc thứ 10 được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi không chỉnh sửa (unmodified primers) đặc hiệu với aptamer dưới điều kiện tương tự trong quá trình chọn lọc. Tuy nhiên, số vòng của phản ứng cần được tối ưu hóa để chỉ thu được sản phẩm chính với lượng tối đa. Ngoài ra, quá trình kéo dài cuối cùng của phản ứng PCR (final extension) cần được thực hiện trong 15 - 20 phút để đảm bảo deoxyadenosine (A) được thêm vào đầu 3' của sản phẩm. Các sản phẩm PCR ứng với số vòng khuếch đại khác nhau được điện di trên gel agarose 2% để chọn ra mẫu sáng nhất, đồng thời không có band phụ. Sản phẩm PCR này sử dụng để tạo dòng. Tạo dòng sử dụng

TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, với One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*. Đầu tiên, chuẩn bị đĩa thạch chứa môi trường LB và môi trường LB lỏng. Thêm 50 µg/mL kanamycin vào cả hai loại môi trường. Thực hiện phản ứng tạo dòng như mô tả của nhà sản xuất. Sau 16 - 18 giờ ủ trong 37 °C, quan sát đĩa thạch và chọn ngẫu nhiên 10 - 15 khuẩn lạc và nuôi trong các ống nghiệm riêng chứa 4 mL môi trường LB lỏng, lắc qua đêm ở nhiệt độ 37 °C. Plasmid được tách và tinh sạch bằng GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Sau khi thu được plasmid, các đoạn plasmid sẽ được kiểm tra bằng phản ứng bằng PCR với các đoạn mồi đặc hiệu của aptamer để xác định sự có mặt của aptamer (điều kiện của phản ứng tương tự các vòng trước, tuy nhiên số vòng khuếch đại là 20 - 25 vòng). Tinh sạch gel với đoạn DNA mục tiêu và gửi đi giải trình tự.

Trình tự thu được có thể là chuỗi chứa đoạn gene mục tiêu hoặc chuỗi bổ sung của nó. Đối với chuỗi có chứa đoạn gene mục tiêu, sử dụng mồi xuôi (forward primer) và đoạn bổ sung của mồi ngược để tìm đoạn gene mục tiêu. Sau đó kiểm tra kích thước của đoạn DNA thu được. Nếu không tìm được trình tự của mồi xuôi, sử dụng mồi ngược (reverse primer) và trình tự bổ sung của mồi xuôi. Kiểm tra kích thước của đoạn DNA thu được và lấy trình tự bổ sung của nó. Các trình tự hợp lệ đã được căn chỉnh bằng MegaX, và phân tích phả hệ bằng Mfold đã được thực hiện để nhóm chúng vào các họ dựa vào sự tương đồng trong cấu trúc. Các trình tự đại diện được đưa ra là những trình tự có tần suất lặp lại cao nhất và độ ổn định cấu trúc thứ cấp cao nhất. Quy trình chọn lọc aptamer được mô tả trực quan trên **hình 2.2**.



Hình 2.2. Quy trình chọn lọc aptamer cho kháng nguyên LPS *K.pneumoniae*

2.2.3. Mô phỏng ghép nối phân tử và mô phỏng động lực học phân tử

Bắt đầu từ trình tự sơ cấp, cấu trúc bậc hai và bậc ba của aptamer được tạo ra bằng cách sử dụng máy chủ web mFold và RNAComposer [97,98]. Sau đó, một tập lệnh Python nội bộ sử dụng thư viện OpenBabel được sử dụng để chuyển đổi trình tự RNA thành dạng DNA bằng cách thay thế ribose bằng deoxyribose và uracil bằng thymine. Các cấu trúc aptamer DNA 3D thu được đã được tối thiểu hóa năng lượng bằng trường lực MMFF94. Cấu trúc 3D của LPS *K.pneumoniae* được tạo ra bằng cách sử dụng máy chủ web CHARMM-GUI [99]. Quá trình ghép nối phân tử của các aptamer với LPS *K.pneumoniae* được thực hiện bằng gói phần mềm Schrödinger 2016.4 [100], với giao thức ghép nối linh hoạt cho phép thư giãn cục bộ hạn chế. Các tư thế ghép nối được chấm điểm dựa trên năng lượng ghép nối và số lượng liên kết hydro liên phân tử (liên kết H).

Mô phỏng động lực học phân tử được thực hiện bằng gói GROMACS 2020.7 [101] với lực CHARMM36 [102]. Các phức hợp aptamer-LPS thu được từ quá trình ghép nối được hòa tan trong các hộp nước hình khối với khoảng cách tối thiểu là 1,5 nm từ chất tan đến thành hộp. Mô hình nước TIP3P [103] đã được sử dụng và NaCl được thêm vào với nồng độ 150 mM để trung hòa hệ thống và mô phỏng các điều kiện sinh lý. Tĩnh điện tầm xa được xử lý bằng phương pháp Particle Mesh Ewald (PME) [104], với ngưỡng cắt là 1,2 nm được áp dụng cho tương tác tĩnh điện và van der Waals. Độ dài liên kết liên quan đến hydro được hạn chế bằng thuật toán LINCS [105]. Mỗi hệ thống trải qua quá trình giảm thiểu năng lượng dốc nhất, sau đó là cân bằng trong tập hợp NPT ở 310 K và 1 atm. Bộ điều nhiệt V-rescale [106] và barostat Berendsen [107] đã được sử dụng trong quá trình cân bằng, với các hạn chế vị trí (1000 kJ/mol/nm^2) được áp dụng cho các nguyên tử nặng. Sau đó, các mô phỏng sản xuất được thực hiện trong 200 ns với bước thời gian 2 fs bằng bộ điều nhiệt V-rescale và barostat Parrinello–Rahman [108].

Để phân tích các đặc tính cấu trúc và năng lượng của liên kết aptamer-LPS, các quỹ đạo đã được kiểm tra về RMSD, RMSF, sự hình thành liên kết H, số phối trí và năng lượng tự do liên kết. Số phối trí giữa các phân tử A và B được tính như sau:

$$S = \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{1 - (r_{ij}/r_0)^n}{1 - (r_{ij}/r_0)^m}$$

trong đó, r_{ij} là khoảng cách giữa nguyên tử i của phân tử A và nguyên tử j của phân tử B. Khoảng cách cắt $r_0 = 8A_0$, với số mũ $n = 6$ và $m = 12$, được sử dụng để ghi lại các tiếp xúc phân tử lớp thứ nhất đồng thời đảm bảo sự phân rã trơn tru, có thể phân biệt được gần điểm cắt. Theo định nghĩa, số phối trí tiến tới 0 tại r_{ij} lớn (tiếp xúc yếu) và tiến tới 1 tại khoảng cách ngắn (tiếp xúc hoàn toàn).

Năng lượng tự do liên kết được ước tính từ các ảnh chụp nhanh cân bằng bằng phương pháp MM/GBSA [109] được triển khai trong gmx_MMPBSA Python [110,111]. Việc trực quan hóa và tạo hình được thực hiện bằng VMD [112].

2.2.4. *Khảo sát tính chất và các kỹ thuật phân tích*

- **Phép thử oligonucleotide gắn enzyme (ELONA) nhằm đánh giá mức độ làm giàu của thư viện aptamer**

Phép thử oligonucleotide gắn enzyme (ELONA) được sử dụng để đánh giá mức độ làm giàu của thư viện trong suốt quá trình SELEX. Trước hết, LPS của *K.pneumoniae* được pha loãng trong dung dịch đệm carbonate–bicarbonate (pH 9,6) và được phủ lên đĩa Costar 96-well EIA/RIA ở 4°C qua đêm. Phần LPS không gắn được loại bỏ, sau đó đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch PBS-T (PBS 1X có chứa 0,05% Tween 20). Để ngăn chặn sự gắn kết không đặc hiệu, các giếng được chặn bằng 3% bovine serum albumin ở 37°C trong 2 giờ. Các trình tự aptamer được gắn biotin được làm nóng ở 95°C trong 5 phút, sau đó làm lạnh nhanh trên đá trong ít nhất 10 phút trong dung dịch đệm liên kết. Sau khi rửa ba lần bằng PBS-T, 50 µL dung dịch chứa 200 nM các trình tự gắn biotin được thêm vào mỗi giếng, và đĩa được lắc nhẹ ở 37°C trong 1 giờ. Các trình tự không gắn được loại bỏ, và các giếng tiếp tục được rửa ba lần bằng PBS-T. Tiếp theo, 50 µL dung dịch streptavidin–poly HRP pha loãng 1:10.000 được thêm vào, sau đó ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi rửa thêm năm lần bằng 200 µL PBS-T, 100 µL dung dịch cơ chất TMB được thêm vào mỗi giếng và ủ trong bóng tối ở 37°C trong 10 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 25 µL H₂SO₄ 0,5 M, và mật độ quang được đo tại 450 nm bằng máy đo quang phổ tấm vi giếng Agilent BioTek Epoch (Epoch, Agilent Technologies, USA).

- **Phân tích tương tác giữa aptamer và LPS bằng kỹ thuật tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS)**

Các hạt nano vàng (AuNPs) được tổng hợp bằng phương pháp khử citrate của axit chlorauric (HAuCl₄) theo quy trình Turkevich–Frens, thu được các hạt hình cầu đơn phân tán với đường kính trung bình khoảng 15 ± 2 nm [113]. Để tạo nền cảm biến, AuNPs (OD 10) trước tiên được gắn với streptavidin (91 µg/mL), sau đó ủ với aptamer gắn biotin (430 µg/mL) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, LPS (71,5 µg/mL) của *K.pneumoniae* được thêm vào và ủ trong 30 phút trước khi tiến hành đo phổ SERS. Liên kết streptavidin–biotin đảm bảo việc cố định bền vững các aptamer trên bề mặt AuNP, trong khi sự tương tác tiếp theo với LPS gây ra biến đổi cấu trúc không gian của aptamer, làm thay đổi môi trường phân tử cục bộ. Những thay đổi này ảnh hưởng đến dao động nội phân tử của phức hợp aptamer–LPS, dẫn đến sự dịch chuyển và thay đổi cường độ các đỉnh SERS. So sánh phổ trước và sau khi thêm

LPS cung cấp bằng chứng trực tiếp về sự gắn kết đặc hiệu aptamer–LPS, đồng thời mang lại hiểu biết sâu hơn về cơ chế nhận diện phân tử của chúng.

- **Phân tích tương tác giữa aptamer và LPS bằng phổ trở kháng điện hóa (EIS)**

Các phép đo EIS được thực hiện bằng máy đo điện thế/pin thế kế (Potentiostat/Galvanostat) (CS350M, Cortest Instruments, Trung Quốc). Điện áp xoay chiều được thiết lập ở 10 mV, dải tần số dao động từ 0,05 Hz đến 10 kHz, với điện cực so sánh Ag/AgCl. Phổ trở kháng được thể hiện dưới dạng đồ thị Nyquist, và toàn bộ dữ liệu được xử lý bằng phần mềm CS Studio6. Các phép đo trở kháng được tiến hành trong dung dịch chứa 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (tỷ lệ mol 1:1) trong 0,1 M KCl. Đồ thị Nyquist thu được thể hiện sự thay đổi điện trở chuyển điện tích (R_{CT}), trong đó sự tăng R_{CT} cho thấy quá trình gắn kết LPS đã xảy ra, dẫn đến sự ức chế truyền electron. Thông qua việc phân tích dữ liệu EIS, độ nhạy, tính chọn lọc và hiệu suất tổng thể của cảm biến dựa trên aptamer được đánh giá. Phương pháp này góp phần phát triển một hệ thống phát hiện LPS nhanh và chính xác phục vụ cho các ứng dụng y sinh học và môi trường.

- **Phép đo voltammetry xung vi phân (DPV) để xác định hằng số phân ly (K_d)**

Hằng số phân ly (K_d) của aptamer được chọn đối với lipopolysaccharide (LPS) được xác định bằng kỹ thuật voltammetry xung vi phân (DPV) — một phương pháp điện hóa có độ nhạy cao. Trong quy trình này, LPS được cố định trên điện cực biến tính bằng hạt nano vàng (AuNPs) thông qua lớp đơn tự sắp xếp của cysteamine (SAM), cho phép theo dõi các sự kiện gắn kết đặc hiệu giữa aptamer và LPS thông qua sự thay đổi trong đáp ứng điện hóa. Các điện cực đã được cố định LPS được ủ với các nồng độ aptamer khác nhau (0 – 100 nM), và phép đo DPV được thực hiện trong sự có mặt của cặp oxi hóa–khử $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Sự thay đổi của dòng đỉnh (ΔI) thu được được biểu diễn theo nồng độ aptamer để xây dựng đường cong gắn kết. Hằng số phân ly (K_d) được xác định bằng cách khớp dữ liệu với mô hình đẳng nhiệt Langmuir, mô tả trạng thái cân bằng giữa các phức hợp aptamer–LPS tự do và gắn kết, theo phương trình:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\max} [Aptamer]}{K_d + [Aptamer]}$$

Trong đó:

ΔI là tín hiệu dòng điện tại một nồng độ aptamer nhất định.

$\Delta I_{\max}$ là tín hiệu dòng điện cực đại tại trạng thái bão hòa.

$[Aptamer]$ là nồng độ aptamer tính theo đơn vị mol.

K_d là hằng số phân ly, biểu thị nồng độ tại đó xảy ra một nửa mức gắn kết cực đại.

Giá trị K_d thu được phản ánh ái lực liên kết của aptamer, cung cấp thông tin quan trọng về khả năng tương tác và mức độ phù hợp của aptamer trong việc phát hiện LPS cho các ứng dụng cảm biến sinh học.

2.3. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho trực khuẩn *P.aeruginosa*

Trộn 50 μ L thư viện ssDNA vào 150 μ L dung dịch chứa vi khuẩn *P. aeruginosa* bất hoạt nồng độ 10^8 CFU/mL. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ (hoặc 4 $^{\circ}$ C qua đêm), (lắc nhẹ khoảng 50 rpm để đảm bảo sự tiếp xúc tốt nhất giữa aptamer và vi khuẩn). Sau ủ, ly tâm mẫu ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút để tách vi khuẩn ra khỏi dung dịch (thu cặn, bỏ dịch nổi). Rửa vi khuẩn 3-5 lần bằng 200 μ L dung dịch PBS + 0.05-0.1% Tween-20 để loại bỏ aptamer không liên kết hoặc liên kết yếu. Rửa lần cuối bằng 200 μ L Distilled water (DW) và hoà hỗn hợp với 50 μ L DW. Sau khi rửa, tiến hành tách aptamer đã liên kết với vi khuẩn bằng cách làm nóng hỗn hợp ở 95 $^{\circ}$ C trong 10 phút để giải phóng aptamer khỏi vi khuẩn. Ly tâm mẫu ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút và thu hồi dịch nổi chứa aptamer. PCR để khuếch đại aptamer đã thu hồi với chu trình PCR gồm: 95 $^{\circ}$ C trong 3 phút; 10 chu kỳ: 95 $^{\circ}$ C trong 30 giây, 56 $^{\circ}$ C trong 30 giây, và 72 $^{\circ}$ C trong 30 giây; 72 $^{\circ}$ C trong 5 phút. Tiếp theo, kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 2,5% để xác nhận sự khuếch đại thành công của aptamer. Tinh sạch sản phẩm PCR để loại bỏ các thành phần không mong muốn bằng kit tinh sạch DNA (nếu cần).

PCR bất đối xứng để tạo ssDNA được tiến hành với chương trình 95 $^{\circ}$ C trong 3 phút; 10 chu kỳ: 95 $^{\circ}$ C trong 30 giây, 58,8 $^{\circ}$ C trong 10 giây, và 72 $^{\circ}$ C trong 10 giây, 72 $^{\circ}$ C trong 5 phút. Sử dụng sản phẩm PCR bất đối xứng là ssDNA cho vòng chọn lọc tiếp theo. Lặp lại các bước chọn lọc đến 8-10 vòng, tăng dần độ nghiêm ngặt bằng cách giảm thời gian ủ aptamer (Thời gian ủ của các vòng sau bằng $\frac{3}{4}$ thời gian của vòng trước đó) và của các bước rửa để chọn lọc ra aptamer có ái lực cao và đặc hiệu nhất với *P.aeruginosa*.

Sau chu trình chọn lọc cuối cùng, aptamer sẽ được sử dụng để tạo dòng bằng vector TOPO TA và biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α . Các khuẩn biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB đặc chứa 50 μ g/mL Kanamycine và 40mg/mL Xgal, cấy trải ở 3 thể tích khác nhau: 50 μ L/đĩa, 100 μ L/đĩa và 150 μ L/đĩa, nuôi qua đêm trong tủ ôn nhiệt ở 37 $^{\circ}$ C. Các khuẩn có màu trắng (hoặc xanh nhạt) là những khuẩn mang vector insert, được chọn lọc, nuôi cấy qua đêm ở 37 $^{\circ}$ C trong môi trường LB lỏng chứa 50 μ g/mL Kanamycine, tách plasmid và kiểm tra kích thước bằng insert bằng

PCR với cả 2 loại môi, môi Universer M13 có sẵn trong Vector Topo – DNA và môi Aptamer.

Cấu trúc bậc hai của các aptamer được chọn đã được dự đoán bằng RNAfold. Cấu trúc bậc ba được mô hình hóa bằng RNAComposer. Mô hình 3D của lipopolysaccharide (LPS) của *P. aeruginosa* được xây dựng bằng máy chủ web Glycam. Tương tác liên kết giữa các aptamer và LPS (docking) sau đó được mô phỏng bằng nền tảng HDOCK.

Kiểm tra khả năng liên kết ái lực của các aptamer chọn lọc với các loại vi khuẩn khác gồm có *E. coli* và *K. pneumoniae* nhằm loại bỏ các trình tự liên kết không đặc hiệu. Sau vòng chọn lọc cuối cùng, phân tích trình tự các aptamer được chọn lọc bằng giải trình tự gen.

2.4. Tổng hợp, chức năng hóa, phân tích đặc trưng hạt nano vàng AuNPs

Các hạt nano vàng được tổng hợp theo phương pháp của Turkevich [114]. Các bước tổng hợp được thực hiện như sau: Chuẩn bị nước deion, dung dịch HAuCl_4 phân tán trong nước deion có nồng độ 30 mM, và dung dịch trisodium xitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) nồng độ 34 mM, trong đó tỷ lệ nước deion : dung dịch HAuCl_4 : dung dịch trisodium xitrat là 100:1:3 (thể tích : thể tích : thể tích). Cho nước deion vào bình chứa, thực hiện khuấy và đun sôi nước trong bình tới 100°C . Bổ sung dung dịch HAuCl_4 phân tán trong nước deion có nồng độ 30 mM cho vào bình chứa nước đã được đun sôi. Tiếp tục khuấy trong khoảng 5 phút để phân tán đều dung dịch HAuCl_4 trong toàn bộ thể tích nước trong bình và duy trì nhiệt độ của dung dịch tại 100°C . Nhỏ nhanh dung dịch trisodium xitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) nồng độ 34 mM vào dung dịch trong bình. Phản ứng bắt đầu xảy ra. Màu dung dịch chuyển từ không màu sang màu tím và sau 30 phút dung dịch chuyển sang màu đỏ tươi. Sau 30 phút, tiến hành dừng khuấy và làm lạnh nhanh bằng cách đưa bình phản ứng vào bể chứa đá lạnh đang tan (khoảng 4°C) để chấm dứt quá trình phản ứng tạo hạt nano vàng. Tiến hành quay ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút để thu được hạt. Rửa hạt với nước deion ít nhất hai lần để loại bỏ hóa chất dư sau phản ứng và thu được hạt nano vàng dạng cầu đặc. Sau đó, các hạt AuNP được khảo sát các đặc tính bằng phương pháp quang phổ UV-Vis (máy quang phổ V-770, Jaco, Nhật Bản), tán xạ ánh sáng động và thế Zeta (Thiết bị Zetasizer Nanoseries ZS, Anton Paar) và hình ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) hoạt động ở 200kV (kính hiển vi JEM-2011F, JEOL, Nhật Bản).

2.4.1. Cộng hợp hạt nano vàng và kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal bằng liên kết cộng hóa trị

1 mL AuNP được chức năng hóa với 5 μL của 0,1 mM axit mercaptosuccinic (MUA). Dung dịch được ủ ở 37°C và lắc trong 2 giờ. Nhóm carboxylic trong MUA

được kích hoạt bởi n-hydroxysulfo-succinimide (sulfo-NHS) được xúc tác bởi 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) đồng thời, được gọi là phản ứng ghép đôi EDC/sulfo-NHS. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào huyền phù AuNP theo tỷ lệ 1:250 (thể tích/thể tích) và ủ ở 37°C trong 15 phút. Kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal nồng độ 1 mg/mL được thêm vào hỗn hợp AuNPs đã este hóa với tỷ lệ 1:20 (thể tích/thể tích), ổn định nhiệt độ ở 37°C và lắc dung dịch thêm 1 giờ. Cuối cùng, BSA được thêm vào dung dịch cộng hợp với tỷ lệ 10% thể tích và lắc ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, tạo thành cộng hợp cộng hóa trị dung dịch AuNPs-kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal. Dung dịch cộng hợp được bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các bước tiếp theo.

2.4.2. Cộng hợp hạt nano vàng thụ động với aptamer và cộng hóa trị với kháng thể Goat anti-Mouse IgG

Kháng thể Goat anti-Mouse IgG được gắn lên bề mặt hạt nano vàng dạng cầu thông qua liên kết cộng hóa trị giữa gốc -NH₂ của kháng thể với gốc -COOH của màng đơn lớp tự lắp ghép (SAM) của MUA (mercaptosuccinic acid), nhằm đảm bảo sự ổn định và giữ nguyên hoạt tính nhận biết sinh học của kháng thể. Bổ sung dung dịch axit mercaptosuccinic (MUA) nồng độ 0,1 mM vào dung dịch hạt nano vàng dạng cầu đặc theo tỷ lệ dung dịch MUA:dung dịch hạt nano vàng dạng cầu đặc phân tán là 0,005:1 (thể tích:thể tích). Thực hiện giữ nhiệt độ dung dịch ổn định ở 37°C và lắc trong vòng 2 giờ. Trong thời gian này, gốc -SH của MUA sẽ liên kết với bề mặt của hạt nano vàng, hình thành màng đơn lớp tự lắp ghép SAM trên bề mặt hạt với gốc -COOH hướng ra ngoài bề mặt hạt. Trộn dung dịch N-hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) nồng độ 0,1 M và dung dịch 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua (EDC) 0,2 M theo tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích), thu được dung dịch hỗn hợp Sulfo-NHS và EDC. Bổ sung dung dịch hỗn hợp sulfo-NHS và EDC vào hỗn dịch hạt nano vàng theo tỷ lệ hỗn hợp sulfo-NHS và EDC:hỗn dịch hạt nano vàng là 1:250 (thể tích:thể tích), giữ nhiệt độ ổn định ở 37°C và tiếp tục lắc trong 15 phút, để thu được hỗn dịch hạt nano vàng được este hóa gốc -COOH của màng SAM trên bề mặt hạt. Cho kháng thể Goat anti-Mouse IgG antibody với nồng độ 1 mg/mL vào hỗn dịch hạt nano vàng este hóa với tỷ lệ kháng thể:dung dịch hạt nano vàng este hóa là 1:20 (thể tích:thể tích), giữ nhiệt độ ổn định ở 37°C và tiếp tục lắc thêm 1 giờ, thu được dung dịch hạt cộng hợp. Trong thời gian này, gốc -NH₂ của kháng thể sẽ liên kết cộng hóa trị với gốc -COOH của màng SAM trên bề mặt hạt thông qua nhóm este, tạo thành cộng hợp kháng thể - hạt nano. Cho BSA vào dung dịch cộng hợp với tỷ lệ 10% theo thể tích và lắc ở nhiệt độ phòng

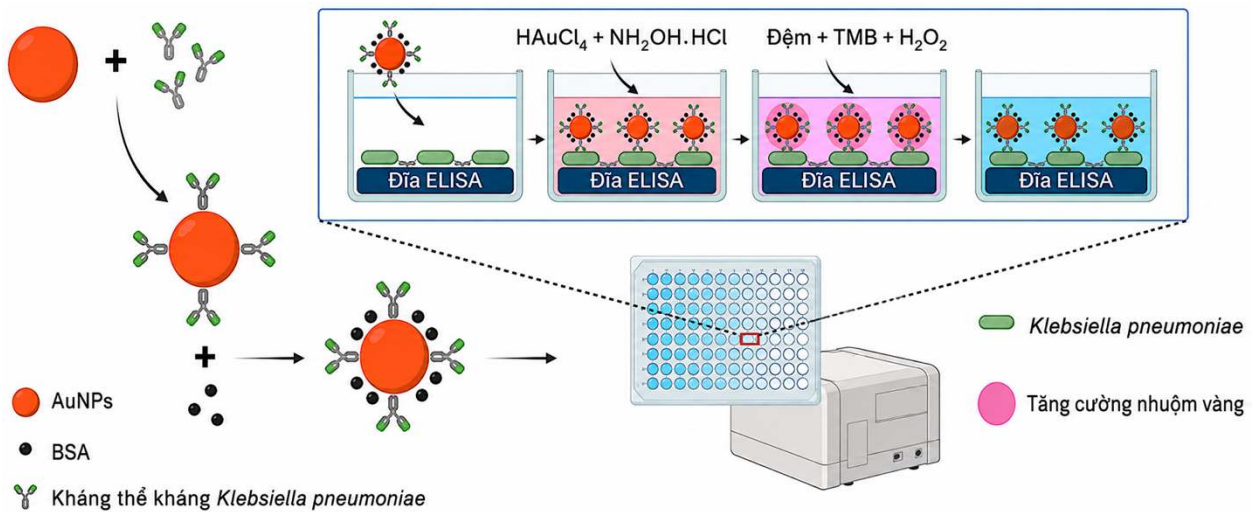
trong 30 phút, thu được dung dịch cộng hợp cộng hóa trị. BSA sẽ thực hiện khóa các liên kết không đặc hiệu của cộng hợp.

Để hoàn thiện hệ hạt cộng hợp, aptamer đặc hiệu với *P.aeruginosa* được gắn thụ động lên hạt nano vàng thông qua tương tác hấp phụ vật lý: Quá trình cộng hợp aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa* lên bề mặt hạt nano vàng (AuNPs) được thực hiện hoàn toàn bên ngoài hệ thống que thử, nhằm tạo ra cộng hợp AuNPs–aptamer có khả năng nhận biết sinh học chọn lọc, đóng vai trò là đầu dò đặc hiệu trong hệ thống phát hiện mục tiêu. Cụ thể, dung dịch hạt nano vàng được chuẩn bị trong môi trường đệm borate có pH 9, điều kiện này giúp ổn định bề mặt hạt nano vàng ở trạng thái điện tích âm, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác hấp phụ giữa bề mặt hạt và aptamer mang điện tích dương cục bộ hoặc có vùng tương tác thuận lợi về điện tích. Quy trình bắt đầu bằng cách thêm 1 phần thể tích (v) dung dịch AuNPs vào ống phản ứng, tiếp theo bổ sung 0.06 phần thể tích (v) dung dịch aptamer có nồng độ 2.8 mg/mL vào cùng một ống. Hỗn hợp này được trộn đều và sau đó được ủ tại nhiệt độ 60°C trong thời gian 60 phút, nhằm đảm bảo aptamer có đủ thời gian để gắn lên bề mặt hạt nano vàng thông qua cơ chế hấp phụ tĩnh điện và liên kết không cộng hóa trị. Trong quá trình ủ, các aptamer được hấp phụ lên bề mặt hạt nano vàng chủ yếu thông qua tương tác tĩnh điện, trong đó khung xương phosphate mang điện tích âm của aptamer tương tác với các vị trí mang điện tích dương trên AuNPs. Sự tương tác này thúc đẩy sự hình thành một lớp vỏ aptamer ổn định bao quanh các hạt nano, từ đó cải thiện độ bền keo và cho phép nhận biết đặc hiệu với mục tiêu. Sau khi kết thúc quá trình liên hợp giữa aptamer và hạt nano vàng, hỗn hợp được tiếp tục sử dụng để hình thành phức hợp với tác nhân đích là vi khuẩn *P.aeruginosa*. Dung dịch vi khuẩn được bổ sung vào hỗn hợp trên với tỉ lệ 1:0,03 (v/v)). Sau khi thêm vi khuẩn, hỗn hợp tiếp tục được ủ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút, điều kiện nhiệt độ này vừa đảm bảo cấu trúc không gian của aptamer không bị phân hủy, vừa thúc đẩy quá trình nhận diện đặc hiệu giữa aptamer và *P.aeruginosa* diễn ra hiệu quả. Kết quả của quy trình là sự hình thành của phức hợp ba thành phần: AuNPs–aptamer–*P.aeruginosa*, trong đó aptamer đóng vai trò cầu nối nhận diện sinh học giữa hạt nano vàng và vi khuẩn. Cộng hợp này được sử dụng như một thành phần mang tín hiệu đầu vào, sẵn sàng cho bước tiếp theo trong quy trình phát hiện sinh học hoặc lắp ráp vào hệ thống que thử, nơi kháng thể kháng *Pseudomonas* polyclonal được cố định tại vạch thử (T-line) để bắt giữ phức hợp này, tạo ra tín hiệu màu sắc có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

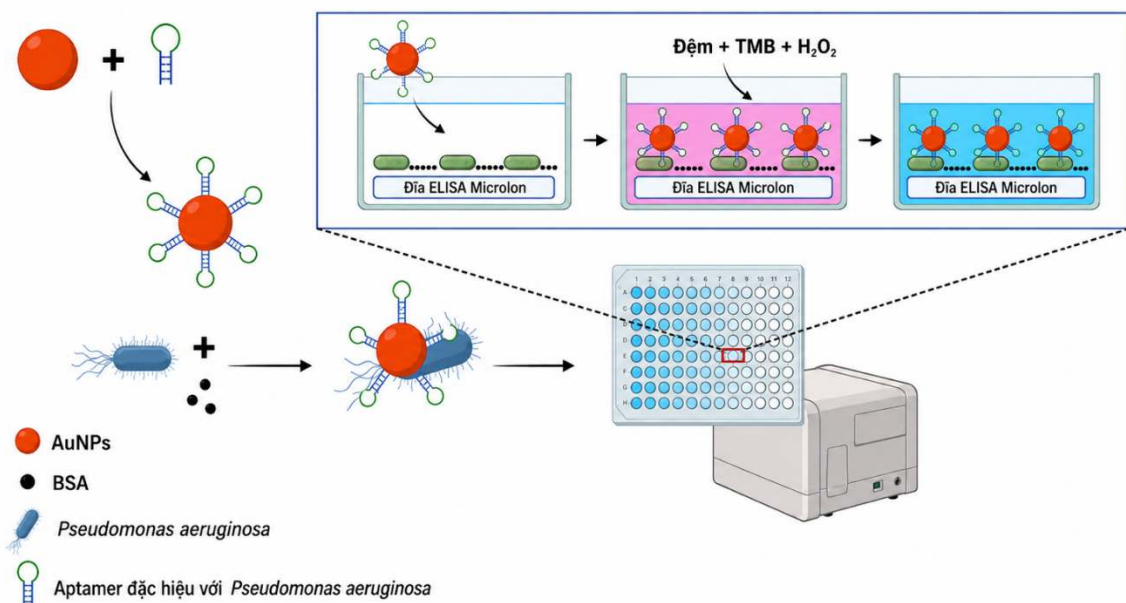
2.5. Phát triển hệ nano-ELISA một bước

Nano-ELISA hoạt động dựa trên cơ chế sử dụng hạt nano AuNPs mang hoạt tính mô phỏng enzyme peroxidase trong phản ứng ELISA xúc tác cho phản ứng phân

hủy H_2O_2 , từ đó oxy hóa các cơ chất như 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) tạo ra màu xanh lam–lục. Quy trình thử nghiệm được mô tả chi tiết trên **hình 2.3** và **hình 2.4**.



Hình 2.3. Quy trình thử nghiệm nano-ELISA phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae*



Hình 2.4. Quy trình thử nghiệm nano-ELISA phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa*

2.5.1. Tối ưu hóa các thành phần tham gia hệ nano-ELISA

Các điều kiện tối ưu hóa đối với các thành phần tham gia hệ nano-ELISA bao gồm: hoạt tính enzyme của hạt nano vàng (còn gọi là nanozyme), nồng độ TMB, nồng độ H_2O_2 , nồng độ kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal/aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa*, nồng độ $HAuCl_4$ và $NH_2OH.HCl$ cho phản ứng nhuộm tăng cường.

Hoạt tính nanozyme đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng TMB làm cơ chất sinh màu. Nồng độ của cơ chất TMB và H_2O_2 được xem xét là yếu tố để tối ưu hóa quy trình. Các xét nghiệm đã được thực hiện để tối ưu hóa nồng độ cơ chất TMB trong tấm polystyrene như sau: 25 μL AuNP tổng hợp được trộn với các lượng khác nhau (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 30 μL) dung dịch TMB 10 mg/mL và 15 μL H_2O_2 30%. Để tối ưu hóa nồng độ H_2O_2 , 25 μL AuNP tổng hợp được trộn với 1,5 μL dung dịch TMB 10 mg/mL và các lượng khác nhau của H_2O_2 30% (0, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200 μL). Các phản ứng được đo ở bước sóng 650 nm bằng máy đọc vi mạch hấp thụ (Epoch, Biotek Instruments, Đức) cứ sau 2 phút trong 30 phút.

Quá trình tối ưu hóa hấp phụ vật lý tạo cộng hợp hạt nano vàng và kháng thể được thực hiện với 25 μL dung dịch AuNPs tổng hợp ở pH 9.0. Các lượng khác nhau (0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15 μL) kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal 100 $\mu\text{g/mL}$ được thêm vào và ủ trong 30 phút. Sau đó, lượng cơ chất TMB và H_2O_2 tối ưu được thêm vào để đo hoạt tính xúc tác. Các phản ứng được đo ở bước sóng 650 nm cứ sau 2 phút trong 30 phút.

Quá trình tối ưu hóa hấp phụ vật lý tạo cộng hợp hạt nano vàng và aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa* được thực hiện với 25 μL dung dịch AuNPs tổng hợp ở pH 9.0. Các lượng khác nhau (pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} từ nồng độ aptamer gốc 2,8 mg/mL) aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa* được thêm vào và ủ trong 1 giờ ở 60°C . Sau đó, lượng cơ chất TMB và H_2O_2 tối ưu được thêm vào để đo hoạt tính xúc tác. Các phản ứng được đo ở bước sóng 650 nm.

Đối với phản ứng cộng hợp thụ động hạt vàng và kháng thể, 1 mL AuNPs ở pH 9.0 được ủ với lượng kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal tối ưu trong 30 phút. Sau khi ly tâm để loại bỏ kháng thể dư, dung dịch BSA 1% được thêm vào để khóa, và sau đó cộng hợp AuNPs-kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal được bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đối với phản ứng cộng hợp thụ động hạt vàng và aptamer, 1 mL AuNPs ở pH 9.0 được ủ với lượng aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa* tối ưu trong 1 giờ ở 60°C . Cộng hợp AuNPs- aptamer đặc hiệu với *P. aeruginosa* được bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Quy trình nhuộm tăng cường bao gồm hai thành phần, bao gồm nồng độ HAuCl_4 và $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$. Các xét nghiệm tối ưu hóa nồng độ HAuCl_4 được thực hiện với 25 μL AuNP tổng hợp được trộn với các nồng độ khác nhau (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 mM) HAuCl_4 và 80 mM $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$. Để tối ưu hóa nồng độ $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$, 25 μL AuNP tổng hợp được trộn với HAuCl_4 1,5 mM và các nồng độ khác nhau (0, 10, 20, 30, 50, 80, 100, 150 mM) $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$. Các hỗn hợp được ủ trong 30 phút. Sau đó, lượng cơ

chất TMB và H_2O_2 tối ưu được thêm vào để đo hoạt tính xúc tác. Các phản ứng được đo ở bước sóng 650 nm.

2.5.2. Quy trình tăng cường nhuộm và thử nghiệm Nano-ELISA phát hiện *K.pneumoniae*

100 μ L *K.pneumoniae* nuôi cấy ở các độ pha loãng nối tiếp (10^1 đến 10^8 CFU/mL) được thêm vào các giếng và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ngày hôm sau, các giếng được rửa bằng PBS-T (PBS 1X pH 7,4, 0,05% Tween-20), sau đó được chặn bằng BSA 1% trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng PBS-T, 25 μ L cộng hợp AuNPs-Rabbit anti- *K.pneumoniae* polyclonal được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở 37°C . Sau đó, các giếng được rửa và nhuộm bằng $HAuCl_4/NH_2OH.HCl$. 50 μ L mỗi nồng độ $HAuCl_4$ và $NH_2OH.HCl$ tối ưu được thêm vào mỗi giếng. Các giếng được ủ trong 30 phút. Các giếng được rửa ba lần, sau đó cơ chất TMB và H_2O_2 được thêm vào mỗi giếng. Các xét nghiệm miễn dịch được đo ở bước sóng 650 nm (**Hình 2.3**).

2.5.3. Thử nghiệm Nano-ELISA phát hiện *P.aeruginosa*

100 μ L *P. aeruginosa* nuôi cấy ở các độ pha loãng nối tiếp (10^1 đến 10^9 CFU/mL) được thêm vào các giếng và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ngày hôm sau, các giếng được rửa bằng PBS-T (PBS 1X pH 7,4, 0,05% Tween-20), sau đó được chặn bằng BSA 1% trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng PBS-T, 25 μ L cộng hợp AuNPs-aptamer đặc hiệu *P. aeruginosa* được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở 37°C . Sau đó, các giếng được rửa ba lần, cơ chất TMB và H_2O_2 được thêm vào mỗi giếng. Các xét nghiệm miễn dịch được đo ở bước sóng 650 nm (**Hình 2.4**).

2.5.4. Xác định độ nhạy, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ), độ đặc hiệu của phương pháp

Giá trị OD_{650} của 20 mẫu âm tính được đo bằng phương pháp Nano-ELISA. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các giá trị OD_{650} được tính toán. Giá trị ngưỡng được đo bằng giá trị trung bình cộng với ba lần độ lệch chuẩn để xác định mẫu dương tính hay âm tính.

LoD và LoQ được xác định theo công thức [115]:

$$LoD = 3.3 \times \sigma / S$$

$$LoQ = 10 \times \sigma / S$$

Trong đó, σ và S lần lượt là độ dốc của đường chuẩn và độ lệch chuẩn của mẫu trắng

Thử nghiệm nano-ELISA kết hợp nhuộm tăng cường phát hiện *K.pneumoniae* đã được tiến hành với các mẫu đối chứng: *P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium*; thử nghiệm nano-ELISA phát hiện *P.aeruginosa* đã được tiến hành với các mẫu đối

chứng: *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium* nhằm đánh giá độ đặc hiệu của xét nghiệm miễn dịch. Các phản ứng được đo ở bước sóng 650 nm. Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện ba lần, và sự khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA) của GraphPad Prism (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA, Hoa Kỳ). Dữ liệu của mỗi nhóm ($N = 3$) được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Mức ý nghĩa thống kê được đặt ở mức $p < 0,05$.

2.6. Thiết kế và chế tạo hệ sắc ký miễn dịch LFIA

2.6.1. Tối ưu dung dịch đệm chạy que thử

Trong các hệ thống que thử dòng chảy bên (LFIA) sử dụng hạt nano vàng (AuNPs), việc lựa chọn hệ đệm có vai trò quan trọng trong việc duy trì độ ổn định keo của AuNPs, hạn chế hiện tượng kết tụ và đảm bảo hiệu quả liên kết sinh học giữa AuNPs với kháng thể hoặc aptamer. Mỗi loại đệm có những đặc điểm riêng ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng di chuyển của hạt trên màng nitrocellulose cũng như cường độ tín hiệu màu của que thử.

- **Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane):** Là hệ đệm thường được sử dụng trong các hệ AuNPs hoạt động ở pH trung tính đến kiềm. Tris có ưu điểm là ít tương tác với bề mặt vàng nên giúp duy trì độ ổn định phân tán của AuNPs trong quá trình bảo quản và chạy que thử. Ngoài ra, Tris hỗ trợ duy trì hoạt tính sinh học của kháng thể hoặc aptamer gắn trên AuNPs, từ đó cải thiện tín hiệu tại vạch thử.
- **Borate:** Đệm borate phù hợp trong các hệ cân pH kiềm nhẹ và thường được ứng dụng khi AuNPs được phủ polymer hoặc phân tử sinh học có chứa nhóm hydroxyl. Tuy nhiên, borate có thể làm thay đổi điện tích bề mặt của AuNPs và ảnh hưởng đến hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt, từ đó tác động đến cường độ màu đỏ đặc trưng của hạt nano vàng. Vì vậy, khi sử dụng trong LFIA cần tối ưu nồng độ và pH để tránh hiện tượng giảm tín hiệu hoặc kết tụ hạt.
- **PBS (Phosphate-Buffered Saline):** PBS được sử dụng phổ biến trong các hệ LFIA nhờ khả năng duy trì môi trường sinh lý ổn định và tương thích tốt với protein. Tuy nhiên, ion phosphate và nồng độ muối cao trong PBS có thể làm giảm độ ổn định keo của AuNPs, đặc biệt đối với các hạt chưa được phủ bảo vệ đầy đủ, dẫn đến hiện tượng kết tụ và giảm khả năng di chuyển trên màng nitrocellulose. Do đó, PBS thường được sử dụng ở nồng độ thấp hoặc kết hợp với các chất ổn định như BSA, Tween-20 hoặc sucrose.

- **HBS (HEPES Buffered Saline):** HBS được đánh giá là hệ đệm phù hợp cho AuNPs trong các ứng dụng LFIA nhờ khả năng duy trì pH ổn định và hạn chế ảnh hưởng đến bề mặt vàng. HEPES giúp ổn định kích thước hạt và giảm hiện tượng kết tụ trong quá trình lưu trữ cũng như chạy mẫu.
- **MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid):** MES thích hợp cho các bước cộng hợp hoặc xử lý AuNPs trong môi trường pH axit nhẹ. Đệm này ít tương tác với bề mặt vàng và giúp duy trì độ ổn định của hạt trong điều kiện pH thấp.

Trong nghiên cứu này, 5 loại đệm đã được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của chúng lên hiệu suất cộng hợp và tính ổn định của hạt nano vàng. Kết quả từ các phân tích phổ UV-Vis, Zeta potential sẽ cung cấp cái nhìn tổng quan về sự tương tác giữa hạt nano và môi trường đệm, từ đó đưa ra lựa chọn tối ưu cho các ứng dụng cụ thể. Đầu tiên hạt nano vàng được phân tán trong các loại đệm trên, các dung dịch đệm được sử dụng có nồng độ 10 mM, đây được cho là nồng độ phù hợp để duy trì hoạt tính sinh học của kháng thể. Các dung dịch đệm được bổ sung thêm các chất là BSA, Tween 20, sucrose với nồng độ phần trăm sử dụng lần lượt tương ứng là 0,1%, 0,5%, và 0,5%. Sau khi phân tán, tiến hành khảo sát mức độ ổn định của hạt trong dung dịch đệm này bằng phương pháp quan sát trực tiếp trên que thử, phân tích phổ UV-vis, và phân tích phổ thế Zeta (Zeta potential).

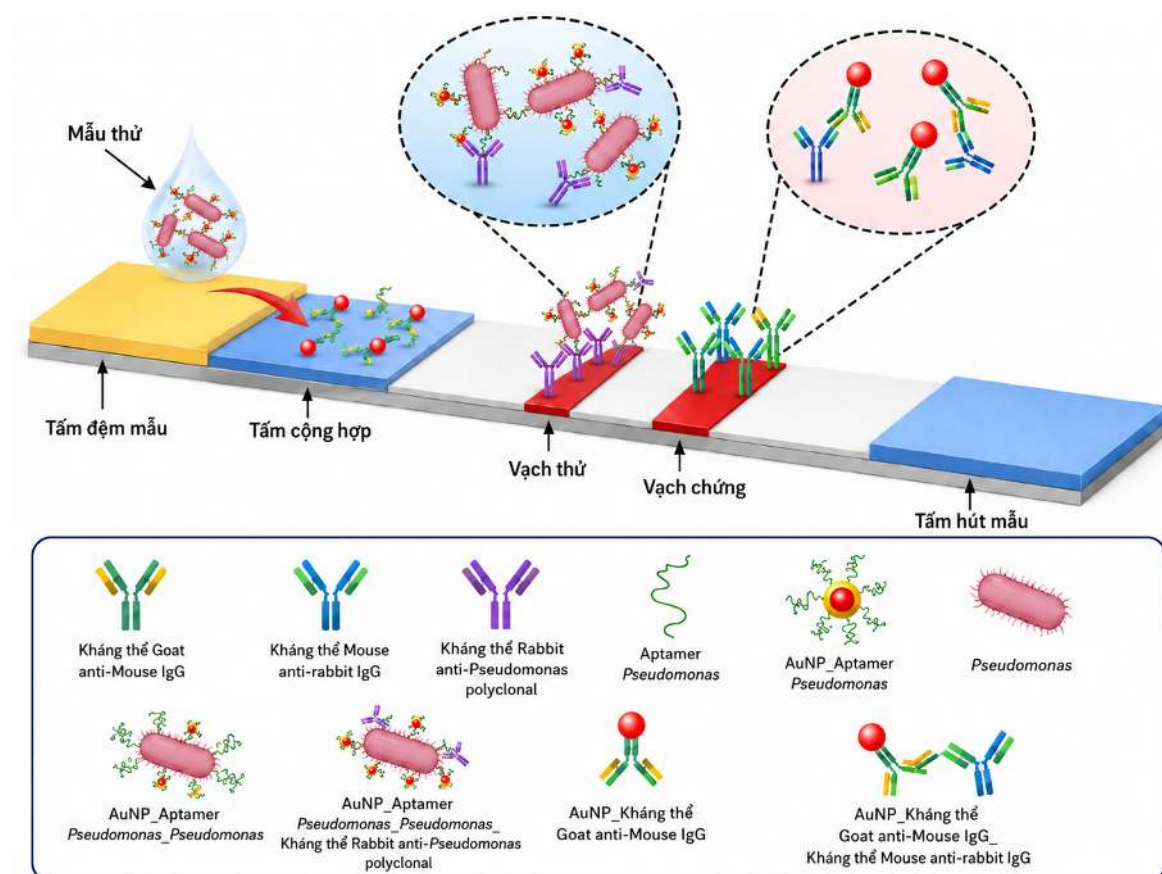
2.6.2. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện *K.pneumoniae*

- **Chuẩn bị các tấm màng của que thử**

Que thử LFIA bao gồm 4 miếng màng: màng hút mẫu, màng liên hợp, màng nitrocellulose (NC) và màng hấp thụ mẫu. Cả màng hút mẫu và các tấm màng liên hợp đều được làm từ sợi thủy tinh. Tấm sợi thủy tinh được chuẩn bị với kích thước dài 30 cm, rộng 1 cm và dày 0,41 mm. Sau đó, tấm này được ngâm trước trong dung dịch đệm HEPES 10 mM có pH 7,4 và lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ trước khi sấy khô trong 30 phút ở 37°C. Tiếp theo, tấm sợi thủy tinh được ngâm trong dung dịch đệm HEPES 10 mM ở pH 7,4 chứa 1% BSA, 1% sucrose, 0,5% Tween-20 và 0,05% natri azide trong 1 giờ và sấy khô trong 30 phút ở 37°C. Các tấm đệm sau đó được bảo quản ở 4°C để sử dụng. Tấm màng NC được chuẩn bị với thời gian chảy mao quản là 90 giây. Dung dịch đệm HBS 10 mM ở pH 7,4, gồm 0,01 M HEPES và 0,15 M NaCl, với 0,1% BSA, 0,5% sucrose và 0,5% Tween-20, được từ từ nhỏ lên bề mặt màng. Sau đó, màng NC được hút chân không trong 2 giờ và bảo quản ở 4°C để sử dụng.

Trong khi đó, 1 mg/mL kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal và 1 mg/mL kháng thể Mouse anti-rabbit IgG được phun lần lượt lên vạch thử nghiệm và vạch đối chứng, và dung dịch cộng hợp được phun lên miếng đệm cộng hợp đã chuẩn

bị bằng máy phun HGS510 của Hangzhou Autokun Technology. Sau 3 giờ sấy khô ở 37°C trong tủ ẩm, tất cả các bộ phận được lắp ráp. Cuối cùng, dải thử nghiệm LFIA với chiều rộng 3 mm được cắt bằng máy cắt Guillotine HGS210 của Hangzhou Autokun Technology và lắp ráp thành một băng cassette cho xét nghiệm sau. Que thử được lắp ráp với nguyên lý bắt cặp sandwich phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae* (Hình 2.5).



Hình 2.5. Nguyên lý của que thử nhanh sử dụng kháng thể phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae*

- **Định lượng vạch thử LFIA bằng hệ thống đo độ bão hòa màu**

Trộn 30 μL vi khuẩn *K.pneumoniae* với 30 μL dung dịch đệm Tris pH 10,8 chứa 0,1% BSA, 0,5% Sucrose và 0,5% Tween 20. Sau đó, nhỏ từng giọt 60 μL hỗn hợp vào ô chứa mẫu của que thử. Đợi que thử 15 phút trước khi đọc kết quả. Kết quả có thể bị mất hiệu lực nếu quá trình thử kéo dài hơn 30 phút. Sau đó, độ bão hòa màu của các vạch trên que thử LFIA được đo định lượng bằng ứng dụng đo màu. Đầu tiên, hình ảnh chất lượng cao của các que thử LFIA được chụp bằng camera điện thoại thông minh, đảm bảo điều kiện ánh sáng nhất quán để giảm thiểu sự thay đổi màu sắc do các yếu tố bên ngoài. Hình ảnh vạch T được chụp trong điều kiện ánh sáng 335 lux. Tiếp theo, ứng dụng Color Grab được sử dụng để chụp ảnh các dải thử nghiệm, đảm bảo các vạch thử nghiệm được nhìn thấy rõ ràng và các hình ảnh được chụp trong điều kiện ánh sáng đồng đều. Sau khi chụp ảnh, các công cụ của ứng dụng sẽ

chọn vùng quan tâm (ROI) trên các dải thử nghiệm LFIA nơi các vạch xuất hiện. Ứng dụng cung cấp thông tin màu sắc, bao gồm các giá trị bão hòa cho các vùng đã chọn. Các giá trị bão hòa cho mỗi vạch thử nghiệm được ghi lại, đảm bảo phép đo nhất quán khi sử dụng cùng kích thước và vị trí ROI. Bằng cách sử dụng ứng dụng máy đo màu, dữ liệu được thu thập nhanh chóng và chính xác. Các giá trị bão hòa sau đó được so sánh với các đường chuẩn hoặc giá trị tham chiếu để diễn giải kết quả một cách định lượng.

2.6.3. Chế tạo que thử nhanh LFIA phát hiện *P.aeruginosa*

- Chuẩn bị các tấm màng của que thử
- Chuẩn bị màng Nitrocellulose (NC)

Quy trình xử lý màng NC được tiến hành như sau: Chuẩn bị tấm màng nitrocellulose (NC), loại có thời gian dòng mao dẫn 90 giây, tức là lượng thời gian (giây) cần thiết để dung môi di chuyển hết 4,0 cm chiều dài là 90 giây và, có kích thước là 23,5 cm x 30 cm, trong đó đầu dự kiến gắn màng hấp thụ và đầu dự kiến gắn tấm cộng hợp là 2 đầu tấm màng NC theo chiều 3,5 cm. Nhỏ từ từ dung dịch đệm HBS nồng độ 10 mM có pH 7,4 (tức là dung dịch bao gồm 0,01 M HEPES và 0,15 M NaCl) có chứa 0,1% BSA, 0,5% sucrose, 0,5% Tween-20 lên màng. Tiếp theo, màng NC được hút chân không trong 2 giờ và sau đó bảo quản ở môi trường 4°C.

Kháng thể Rabbit anti-*Pseudomonas* polyclonal được phân tán trong đệm PBS 10 mM với nồng độ 1 mg/mL và được tiến hành trải lên màng NC tương ứng với vạch T tại vị trí cách đầu dự kiến gắn tấm hấp thụ là 1,8 cm với bề dày của vạch T là 0,09 mm bằng thiết bị phun với tốc độ phun là 0,6 $\mu\text{L}/\text{cm}$, áp suất 0,02 MPa với lượng dung dịch kháng thể sau khi phân tán được sử dụng là 30 μL nồng độ 1 mg/mL. Kháng thể này đóng vai trò là kháng thể bắt giữ lại hạt cộng hợp có mang *P.aeruginosa* tại vạch T.

Kháng thể Mouse anti-Rabbit IgG được phân tán trong đệm PBS 10 mM với nồng độ 1 mg/mL và được tiến hành trải lên màng NC tương ứng với vạch C cách vạch T là 0,5 cm về phía đầu dự kiến gắn tấm hấp thụ và bề dày vạch C là 0,09 mm bằng thiết bị phun với tốc độ phun là 0,6 $\mu\text{L}/\text{cm}$, áp suất 0,02 MPa với lượng dung dịch kháng thể sau khi phân tán được sử dụng là 30 μL nồng độ 1 mg/mL. Mục đích của việc sử dụng kháng thể Mouse anti-Rabbit IgG để minh chứng cho việc có dòng chảy trong màng NC đi qua vùng chứa vạch T và vạch C.

Sau khi trải vạch T và vạch C, màng NC được sấy ở 37 °C trong thời gian 1 giờ, thu được tấm vùng phát hiện và thực hiện bảo quản tấm vùng phát hiện ở ngăn mát tủ lạnh.

- Chuẩn bị màng hút mẫu và màng hấp thụ mẫu

Chuẩn bị tấm đệm mẫu có kích thước 1,5-2,0 cm x 30 cm, là màng tách máu loại FR1 của hãng mdi Membrane Technologies. Trong cấu trúc của que thử phát hiện vi khuẩn từ mẫu máu toàn phần, màng tách huyết cầu được tích hợp ở đầu vào mẫu đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ hồng cầu. Loại màng này có cấu trúc vi xốp với thể tích rỗng cao và khả năng lưu giữ mạnh mẽ, cho phép tách chọn lọc và hiệu quả các thành phần hữu hình trong máu, đặc biệt là hồng cầu, trong khi vẫn cho phép huyết tương và các tác nhân đích như vi khuẩn hoặc phân tử bề mặt vi khuẩn đi qua. Sự hấp phụ chất phân tích trong màng là tối thiểu dẫn đến que thử có độ nhạy cao hơn.

Chuẩn bị tấm hấp thụ có kích thước 1,7 cm x 30 cm, là loại C083 Cellulose Fiber của Millipore. Màng hấp thụ (absorbent pad) hay cũng có thể gọi là tấm bắc (wicking pad). Mục đích của tấm này là làm miếng đệm để hấp thụ tất cả các chất thử mà không bị bắt giữ lại ở vạch T và vạch C trong khi vẫn duy trì dòng mao dẫn qua màng để làm sạch nền. Tốc độ thấm hút của tấm bắc này cũng sẽ ảnh hưởng đến thời gian đọc kết quả xét nghiệm. Tấm bắc phải ngăn chặn dòng chảy ngược của thành phần chất thử dư trong thời gian tối thiểu có thể sau thời gian đọc kết quả xét nghiệm. Hai màng này sẽ được xử lý bằng cách nhúng vào dung dịch chứa 2% NaCl, 0,5% BSA, và 0,1% polyvinylpyrrolidone, rồi sấy khô ở 37°C để qua đêm.

- Chuẩn bị tấm cộng hợp

Chuẩn bị tấm giấy sợi thủy tinh Millipore GFDX có kích thước chiều dài 30 cm, chiều rộng 1 cm và bề dày là 0,41 mm. Việc lựa chọn vật liệu này dựa trên cơ sở các yếu tố giúp duy trì tính toàn vẹn của liên hợp khi sấy khô và bảo quản lâu dài, đồng thời giải phóng liên hợp hoàn toàn sau khi làm ướt bằng môi trường mẫu. Nhúng tấm giấy sợi thủy tinh vào trong dung dịch đệm HEPES nồng độ 10 mM có pH là 7,4 và lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó sấy trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Tiếp theo, tấm giấy sợi thủy tinh được ngâm trong dung dịch đệm HEPES nồng độ 10 mM có pH là 7,4 có chứa 1% BSA, 1% sucroza, 0,5% Tween 20, và 0,05% sodium azide trong thời gian 1 giờ và sấy trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C, thu được tấm sau xử lý. Tấm được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

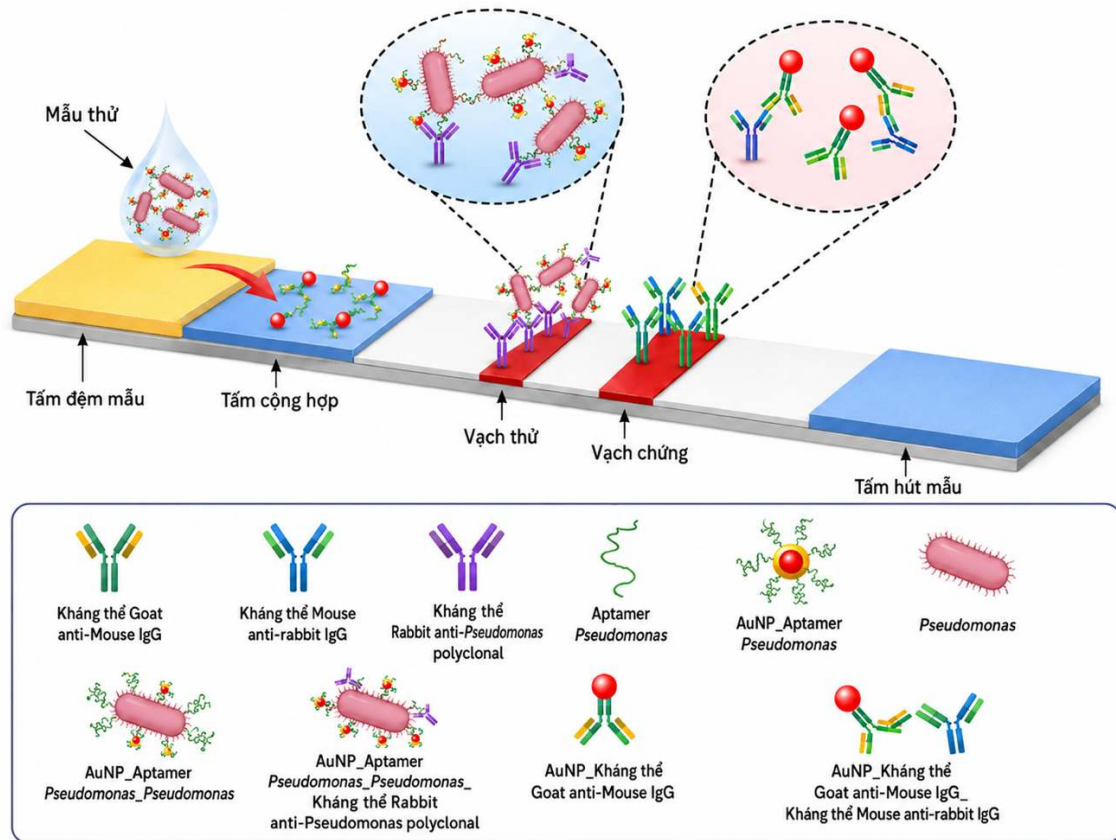
Phun 1 mL dung dịch hạt liên hợp cộng hóa trị lên toàn bộ bề mặt của tấm sau xử lý với tốc độ phun là 9,5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ và áp suất là 0,02 MPa để phân phối dung dịch hạt liên hợp cộng hóa trị đều trên bề mặt của tấm sau xử lý. Sấy khô các tấm sau khi phân phối dung dịch hạt liên hợp cộng hóa trị trong tủ sấy đối lưu không khí cưỡng bức trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C, sau đó để qua đêm trong môi trường chân không có bổ sung độ hút ẩm với độ ẩm < 20%, thu được tấm cộng hợp.

• Lắp ráp que thử

Dán tấm vùng phát hiện NC lên bề mặt tấm mang ở vị trí chính giữa tính theo chiều dài của tấm mang (tức là cách mỗi đầu của tấm mang là 1 cm) cách đầu dự kiến gắn tấm hấp thụ là 1,5 cm và cách đầu dự kiến gắn tấm cộng hợp và tấm đệm mẫu là 2,0 cm. Dán tấm hấp thụ chồng lên tấm vùng phát hiện NC ở phía đầu dự kiến gắn tấm hấp thụ (ở phía đầu gần vùng chứa vị trí vạch C), sao cho chiều ngang các tấm vừa khít nhau, với vùng che phủ khoảng 2 mm giữa 2 tấm. Dán tấm cộng hợp thu được chồng lên tấm vùng phát hiện NC ở phía đầu dự kiến gắn tấm cộng hợp (ở vị trí đầu gần vùng chứa vạch T) sao cho chiều ngang các tấm vừa khít nhau, và với vùng che phủ khoảng 2 mm giữa 2 tấm. Tiếp tục dán tấm đệm mẫu chồng lên tấm cộng hợp ở đầu còn lại của tấm cộng hợp (đầu không dán chồng lên tấm vùng phát hiện) với vùng che phủ khoảng là 2,7 mm giữa 2 tấm, thu được tấm chính (master card). Việc lắp ráp các thành phần của que thử nhanh lên tấm mang có thể được thực hiện bằng tay hoặc sử dụng thiết bị cán màng. Thiết bị này sử dụng chân không để giữ vật liệu tại chỗ và màng cán để đảm bảo vật liệu được ép ở đúng vị trí và hiệu suất lắp ráp có độ chính xác cao. Tấm chính được cắt thành các que có kích thước bề ngang là 3 mm, thu được que thử nhanh.

- **Thử nghiệm que thử phát hiện nhanh *P.aeruginosa***

Que thử được lắp ráp và được ứng dụng theo nguyên tắc sử dụng cộng hợp kép phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa* (**Hình 2.6**). Que thử kết hợp giữa cơ chế nhận diện đặc hiệu của aptamer và liên kết miễn dịch của kháng thể nhằm nâng cao độ đặc hiệu và độ tin cậy trong phát hiện. Trong quy trình chuẩn bị mẫu, aptamer đặc hiệu với vi khuẩn *P.aeruginosa* được gắn lên bề mặt hạt vàng nano (AuNPs) thông qua tương tác hấp phụ vật lý, tạo thành đầu dò AuNPs–aptamer. Đầu dò này sau đó được ủ với mẫu thử, hình thành phức hợp AuNPs–aptamer–vi khuẩn nếu vi khuẩn mục tiêu có mặt trong mẫu. Trong thiết kế của que thử, vùng cộng hợp được nạp sẵn hệ AuNPs–kháng thể Goat anti-Mouse IgG, đóng vai trò là tín hiệu đối chứng. Vạch kiểm tra (T) được cố định kháng thể Rabbit anti-*Pseudomonas* polyclonal cho phép bắt giữ phức hợp AuNPs–aptamer–vi khuẩn thông qua phản kháng nguyên vi khuẩn. Vạch đối chứng (C) được cố định sẵn kháng thể Mouse anti-rabbit IgG để bắt giữ hệ AuNPs–kháng thể Goat anti-Mouse IgG từ vùng cộng hợp. Khi mẫu đã được cộng hợp được nhỏ lên đầu que thử, hỗn hợp di chuyển nhờ hiện tượng mao dẫn dọc theo màng nitrocellulose. Nếu vi khuẩn mục tiêu hiện diện, phức hợp AuNPs–aptamer–vi khuẩn sẽ bị giữ lại tại vạch T, tạo thành vạch màu đỏ tại vị trí này. Đồng thời, hệ đối chứng AuNPs–kháng thể Goat anti-Mouse IgG sẽ tương tác với kháng thể Mouse anti-rabbit IgG tại vạch C và tạo thành vạch màu đỏ, đóng vai trò xác nhận quá trình thử diễn ra bình thường.



Hình 2.6. Nguyên lý của que thử nhanh sử dụng aptamer đặc hiệu phát hiện vi khuẩn *P.aeruginosa*

- **Định lượng vạch thử LFIA**

Để phân tích bán định lượng, hình ảnh vùng vạch thử nghiệm (T) và vạch chứng (C) trên que thử LFIA được xử lý bằng phần mềm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>, truy cập ngày 13 tháng 8 năm 2025). ImageJ là phần mềm phân tích hình ảnh mã nguồn mở, miễn phí, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu khoa học nhờ khả năng đo cường độ tín hiệu dựa trên mật độ điểm ảnh với độ chính xác và độ lặp lại cao. Việc sử dụng ImageJ giúp chuẩn hóa quy trình phân tích, hạn chế sai lệch do đánh giá bằng mắt thường, đồng thời cho phép xuất dữ liệu số hóa phục vụ xử lý thống kê, qua đó nâng cao độ tin cậy của kết quả bán định lượng LFIA.

Hình ảnh được thu nhận ở định dạng ảnh xám 8-bit, trong đó giá trị cường độ điểm ảnh dao động từ 0 — tương ứng với màu đen — đến 255 — tương ứng với màu trắng. Độ sâu bit này được lựa chọn nhằm đảm bảo độ tương phản và mức chi tiết phù hợp cho quá trình nhận diện đặc trưng hình ảnh, đồng thời giảm dung lượng tệp và tải xử lý. Ngoài ra, chế độ ảnh xám giúp loại bỏ ảnh hưởng của thông tin màu sắc, tập trung hoàn toàn vào sự biến thiên độ sáng của tín hiệu.

Nhằm tăng cường sự khác biệt giữa vạch thử nghiệm và nền, chế độ Invert LUT được áp dụng trước khi đo, làm cho các vạch thử nghiệm dương tính mạnh hiện

thị dưới dạng vùng sáng. Sự điều chỉnh này hỗ trợ định lượng chính xác hơn giá trị cường độ điểm ảnh của cả vạch thử nghiệm và vạch chứng. Dữ liệu cường độ thu được sau đó được sử dụng để xây dựng đường chuẩn, trong đó cường độ tín hiệu đo được tỷ lệ thuận với nồng độ *P. aeruginosa* được phát hiện trên que thử LFIA.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chương Kết quả và thảo luận trình bày các kết quả đạt được trong quá trình thực hiện nghiên cứu, bao gồm chọn lọc aptamer đặc hiệu, phát triển các hệ thống phát hiện dựa trên Nano-ELISA và sắc ký miễn dịch dòng chảy bên. Trước hết, quá trình SELEX được tối ưu nhằm làm giàu và sàng lọc các trình tự aptamer có khả năng nhận diện đặc hiệu vi khuẩn mục tiêu, trong đó các thông số kỹ thuật như điều kiện gắn, khuếch đại PCR, PCR bất đối xứng và đánh giá ái lực được phân tích chi tiết. Các kết quả này là cơ sở để lựa chọn các ứng viên aptamer tiềm năng cho phát triển hệ thống cảm biến sinh học.

Tiếp theo, chương trình bày kết quả thiết kế và tối ưu hệ Nano-ELISA trực tiếp nhằm phát hiện *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* dựa trên sự kết hợp giữa kháng thể hoặc aptamer với hạt nano vàng. Hiệu quả của hệ thống được đánh giá thông qua khả năng xúc tác của AuNPs, cường độ tín hiệu màu, độ nhạy, độ đặc hiệu và khả năng ứng dụng trong phân tích định lượng.

Bên cạnh đó, chương cũng trình bày kết quả phát triển hệ sắc ký miễn dịch dòng chảy bên nhằm phát hiện nhanh *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*. Việc tích hợp kỹ thuật liên kết cộng hóa trị, phân tích hình ảnh số và đánh giá cường độ tín hiệu màu cho phép nâng cao độ nhạy và độ ổn định, rút ngắn thời gian phân tích và mở ra tiềm năng ứng dụng trong các hệ thống chẩn đoán nhanh tại chỗ.

3.1. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa*

3.1.1. Chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *K.pneumoniae*

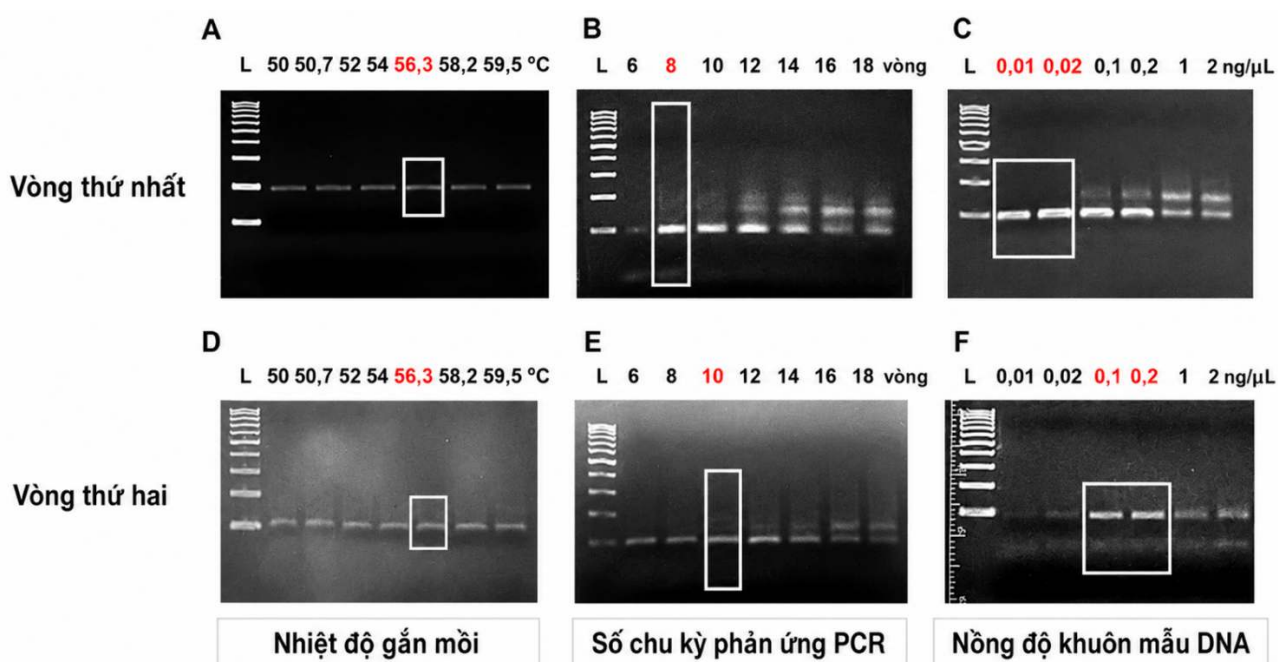
Phản ứng khuếch đại PCR là một bước quan trọng trong quy trình SELEX [116]. Tuy nhiên, việc khuếch đại thư viện DNA ngẫu nhiên khác biệt đáng kể so với quá trình khuếch đại DNA đồng nhất thông thường [117]. Việc khuếch đại không phù hợp thư viện DNA ngẫu nhiên có thể dẫn đến mất sản phẩm chính và tích lũy các sản phẩm phụ không mong muốn, từ đó có thể gây ra thất bại trong quá trình SELEX. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu suất PCR, bao gồm nhiệt độ gắn mẫu, số chu kỳ và nồng độ khuôn, trong hai vòng SELEX đầu tiên đã được khảo sát. Các điều kiện thử nghiệm cho từng yếu tố được tóm tắt trong **Bảng 3.1.**

Bảng 3.1. Tóm tắt các điều kiện tối ưu hóa phản ứng PCR đối xứng trong hai vòng SELEX đầu tiên

STT	Nhiệt độ gắn môi	Số chu kỳ PCR	Nồng độ khuôn mẫu
Thí nghiệm 1	50,0°C 50,7°C 52,0°C 54,0°C 56,3°C 58,2°C 59,5°C	8	0,1 ng/μL
Thí nghiệm 2	56,3°C	6 8 10 12 14 16 18	0,1 ng/μL
Thí nghiệm 3	56,3°C	8-10	0,01 ng/μL 0,02 ng/μL 0,1 ng/μL 0,2 ng/μL 1 ng/μL 2 ng/μL

Như thể hiện trong **Hình 3.1A** và **D**, trong khoảng nhiệt độ gắn môi từ 50°C đến 59,5°C, băng sản phẩm PCR rõ nét nhất với mức độ nhòe tối thiểu được quan sát tại 56,3°C. Ở các nhiệt độ gắn môi cao hơn hoặc thấp hơn, cường độ băng giảm (**Hình 3.1A**) và hiện tượng nhòe tăng (**Hình 3.1D**), mặc dù sự khác biệt không đáng kể. Quan sát này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cho thấy nhiệt độ gắn môi có ảnh hưởng quan trọng hơn đối với các khuôn PCR dài so với các khuôn ngắn như aptamer DNA [116]. Việc khuếch đại quá mức các thư viện DNA ngẫu nhiên có thể

dẫn đến bắt cặp sai ngẫu nhiên, tạo ra các sản phẩm PCR bất thường. Do đó, việc tối ưu số chu kỳ PCR và nồng độ khuôn là cần thiết. Trong vòng SELEX thứ nhất, các sản phẩm phụ không mong muốn xuất hiện từ chu kỳ PCR thứ 10 (**Hình 3.1B**) và ở nồng độ khuôn ssDNA 0,1 ng/ μ L (**Hình 3.1C**). Trong vòng thứ hai, các sản phẩm phụ xuất hiện từ chu kỳ PCR thứ 12 (**Hình 3.1E**) và ở nồng độ khuôn ssDNA 1 ng/ μ L (**Hình 3.1F**). Sự khác biệt này có thể là do sự giảm kích thước thư viện ssDNA hoặc thay đổi về độ tinh khiết của ssDNA qua các vòng chọn lọc [118]. Do đó, mặc dù nhiệt độ gắn môi 56,3 $^{\circ}$ C được xác định là tối ưu, nhưng số chu kỳ và nồng độ khuôn cần được điều chỉnh cẩn thận qua từng vòng, trong phạm vi biến thiên nhỏ, nhằm tránh tạo ra các sản phẩm khuếch đại không mong muốn.



Hình 3.1. Ảnh điện di gel agarose 2% đánh giá các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR đối xứng trong vòng thứ nhất và thứ hai. (A, D) Các nhiệt độ gắn môi khác nhau ($^{\circ}$ C), (B, E) số chu kỳ PCR khác nhau, và (C, F) các nồng độ khuôn DNA khác nhau (ng/ μ L) được khảo sát. Nhiệt độ gắn môi từ 1-7 lần lượt là 50 $^{\circ}$ C, 50,7 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 56,3 $^{\circ}$ C, 58,2 $^{\circ}$ C, 59,5 $^{\circ}$ C. Số chu kỳ phản ứng PCR từ 1-7 lần lượt là 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 vòng. Nồng độ khuôn mẫu từ 1-6 lần lượt là 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 1, 2 ng/ μ L “L” biểu thị thang DNA 100 bp.

Để tái tạo sợi đơn DNA (ssDNA) cho các vòng SELEX tiếp theo, nhiều phương pháp đã được xem xét, bao gồm: tách từ bằng hạt phủ streptavidin, thủy phân sợi có gắn phosphate bằng enzyme lambda exonuclease, tách kích thước trên gel polyacrylamide biến tính dựa trên sự chênh lệch chiều dài giữa hai sợi, và PCR bất

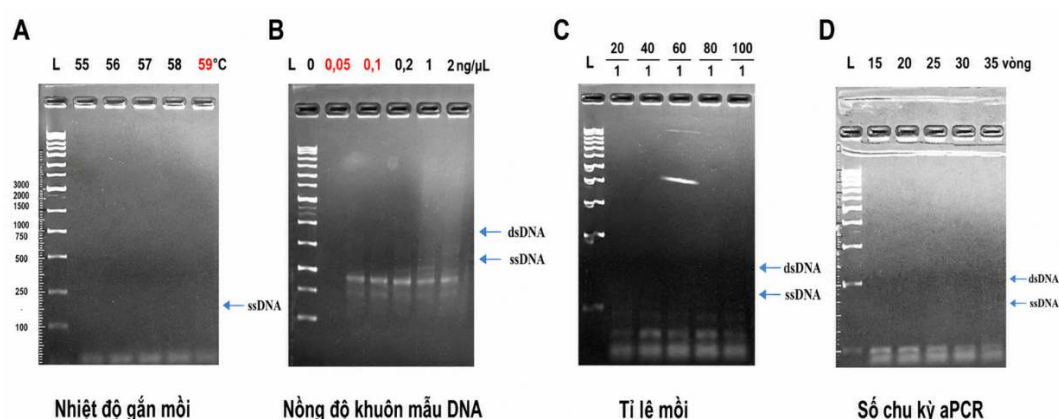
đối xứng. Trong số đó, PCR bất đối xứng (aPCR) được lựa chọn nhờ quy trình đơn giản, yêu cầu ít vật liệu khởi đầu, hiệu quả cao và chi phí thấp [116]. Ngoài ra, sản phẩm của aPCR có thể được sử dụng trực tiếp cho vòng SELEX kế tiếp mà không cần bước tinh sạch bổ sung [119]. Các sản phẩm PCR đã loại bỏ môi được sử dụng cho quá trình tối ưu hóa PCR bất đối xứng. Các yếu tố có thể ảnh hưởng đến hiệu suất tạo ssDNA, bao gồm nhiệt độ gắn môi, nồng độ khuôn cuối cùng, tỷ lệ môi xuôi/ngược, và số chu kỳ phản ứng, đã được khảo sát. Như thể hiện trong **Bảng 3.2**, các băng ssDNA xuất hiện ở vị trí thấp hơn so với các băng dsDNA (91 bp).

Bảng 3.2. Tóm tắt các điều kiện tối ưu hóa phản ứng PCR bất đối xứng

STT	Nhiệt độ gắn môi	Nồng độ khuôn mẫu	Tỷ lệ môi (môi xuôi/môi ngược)	Số chu kỳ PCR
Thí nghiệm 1	55°C 56°C 57°C 58°C 59°C	0,1 ng/μL	20:1	25 chu kỳ
Thí nghiệm 2	59°C	0 ng/μL 0,05 ng/μL 0,1 ng/μL 0,2 ng/μL 1 ng/μL 2 ng/μL	20:1	25 chu kỳ
Thí nghiệm 3	59°C	0,1 ng/μL	20:1 40:1 60:1 80:1 100:1	25 chu kỳ
Thí nghiệm 4	59°C	0,1 ng/μL	Giá trị đã tối ưu	15 chu kỳ 20 chu kỳ 25 chu kỳ

				30 chu kỳ
				35 chu kỳ

Như thể hiện trong **Hình 3.2A**, nhiệt độ gắn môi tối ưu được xác định là 59°C, và nhiệt độ này được lựa chọn cho các vòng SELEX tiếp theo. Trong **Hình 3.2B**, kết quả cho thấy nồng độ khuôn DNA cao hơn 0,1 ng/μL có thể dẫn đến sự xuất hiện của vệt mờ (smearing) và sản phẩm phụ. Đáng chú ý, khi sử dụng lượng khuôn thích hợp, hiệu suất tạo ssDNA và dsDNA không có sự khác biệt đáng kể khi thay đổi tỷ lệ môi xuôi/ngược và số chu kỳ PCR (**Hình 3.2C, D**). Tuy nhiên, như đã được báo cáo, các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR bất đối xứng (asymmetric PCR) trong vòng SELEX đầu tiên sẽ khác so với các vòng sau, do sự giảm dần độ tinh khiết và kích thước của quần thể ssDNA trong quá trình tuyển chọn [118]. Do đó, ngoại trừ nhiệt độ gắn môi 59°C được giữ cố định, các yếu tố khác cần được tối ưu hóa riêng cho từng vòng SELEX, nhưng trong phạm vi biến thiên tối thiểu nhằm duy trì tính ổn định của quá trình khuếch đại.



Hình 3.2. Ảnh điện di gel agarose 4% đánh giá các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR bất đối xứng. (A) Các nhiệt độ gắn môi từ 1-5 lần lượt là 55, 56, 57, 58, 59°C, trong đó “L” là thang chuẩn DNA 100 bp. (B) Các nồng độ khuôn DNA từ 1-6 lần lượt là 0, 0,05, 0,1, 0,2, 1, 2 ng/μL, trong đó “L” là thang chuẩn DNA 25 bp. (C) Các tỷ lệ khác nhau giữa môi xuôi và môi ngược từ 1-5 lần lượt là 20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1, trong đó “L” là thang chuẩn DNA 100 bp. (D) Các số chu kỳ khuếch đại từ 1-5 lần lượt là 15, 20, 25, 30, 35 chu kỳ trong phản ứng aPCR được khảo sát; “L” là thang chuẩn DNA 100 bp.

Tổng hợp lại, các điều kiện PCR và aPCR được tối ưu hóa đã đảm bảo quá trình tái tạo thư viện ssDNA có chất lượng cao với lượng sản phẩm phụ tối thiểu, tạo nền tảng vững chắc cho các vòng SELEX tiếp theo.

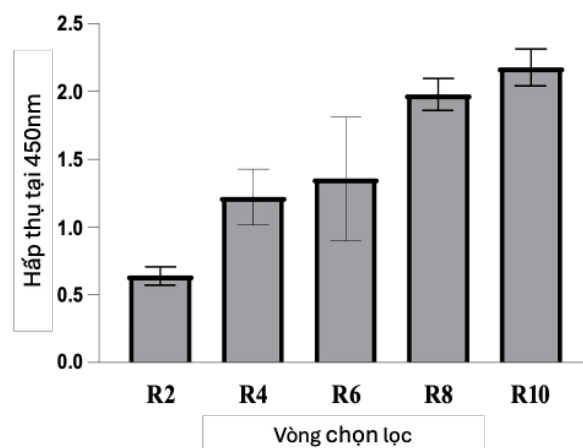
3.1.1.1. Chọn lọc aptamer đặc hiệu với kháng nguyên *K.pneumoniae* trong điều kiện *in vitro*

Trong quy trình SELEX *in vitro* này, LPS từ *K.pneumoniae* (L4268, Sigma-Aldrich) 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. Việc tăng độ khắt khe của quá trình tuyển chọn bằng cách giảm nồng độ mục tiêu và thời gian ủ trong các vòng sau (**Bảng 3.3**) đã chứng minh hiệu quả trong việc làm giàu các trình tự có ái lực cao.

Bảng 3.3. Các thông số SELEX chọn lọc aptamer đặc hiệu LPS của *K.pneumoniae*

Vòng chọn lọc	Nồng độ LPS của <i>K.pneumoniae</i> ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Thời gian ủ (phút)
1	1,00	60
2	0,80	60
3	0,50	60
4	0,20	45
5	0,10	45
6	0,04	45
7	0,04	30
8	0,02	30
9	0,01	30
10	0,01	15

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 3.3**).



Hình 3.3. Quá trình làm giàu thư viện aptamer đặc hiệu với LPS từ *K.pneumoniae* trong SELEX. ssDNA được rửa giải từ mỗi vòng tuyển chọn được khuếch đại bằng PCR, sau đó thực hiện PCR bất đối xứng với mỗi xuôi được gắn biotin và mỗi ngược được phosphoryl hóa. Các phân tử ssDNA gắn biotin được tinh sạch và tiến hành phân tích bằng phép thử oligonucleotide gắn enzyme (ELONA). Biểu đồ thể hiện giá trị hấp thụ ở bước sóng 450 nm của các thư viện aptamer trong các vòng SELEX. Các thí nghiệm được thực hiện độc lập bốn lần.

Quá trình làm giàu các aptamer đặc hiệu với mục tiêu được xác định bằng phép thử oligonucleotide gắn enzyme (ELONA) trong suốt quá trình tuyển chọn. Từ vòng thứ 8, giá trị hấp thụ tại bước sóng 450 nm tăng lên đáng kể so với thư viện ban đầu, cho thấy tỷ lệ aptamer gắn kết với LPS ngày càng tăng (**Hình 3.3**). Sự gia tăng liên tục này khẳng định rằng các aptamer có ái lực với LPS đã được làm giàu, và khả năng gắn kết gần như đạt mức cực đại. Do đó, quá trình tuyển chọn được dừng lại sau vòng thứ 10. Các sản phẩm được làm giàu từ vòng 10 được khuếch đại bằng PCR, chèn vào plasmid và biến nạp vào chủng *E. coli* TOP10, sau đó được giải trình tự. Hình ảnh tách dòng aptamer được thể hiện trong phần phụ lục. Kết quả thu được 15 trình tự đặc trưng, mỗi trình tự xuất hiện ít nhất hai lần. Những trình tự này đại diện cho các ứng viên aptamer ưu thế, và được đưa vào phân tích docking phân tử nhằm đánh giá ái lực gắn kết dự đoán đối với LPS (**Bảng 3.4**). Như vậy, việc làm giàu và nhận diện thành công 15 aptamer tối ưu đã cung cấp nền tảng vững chắc cho các bước mô phỏng docking in silico, mô phỏng động lực học phân tử, và thực nghiệm xác nhận, qua đó cho phép lựa chọn hợp lý các trình tự có tiềm năng nhất cho việc nhận diện LPS.

Bảng 3.4. Danh sách các trình tự aptamer được lựa chọn để thực hiện nghiên cứu mô phỏng trong đề tài này. Các đoạn in đậm biểu thị vùng mỗi được sử dụng cho phản ứng PCR, trong khi các đoạn còn lại là vùng biến đổi của các aptamer.

STT	Trình tự Aptamer	Số lượng nucleotide
1	ATCCGTCACACCTGCTCTACGTAATCTGAGTTTCTTGGTA TAAGGTCTCGGACGTTACTTAGCTGAACTGCAATGGTGTT GGCTCCCGTAT	91
2	ATCCGTCACACCTGCTCTCAGGCTCGATGTAAGGCGCCTT CTACACAGTCTTACCGATCTGTATTCTTGTCGATGGTGTTG GCTCCCGTAT	91
3	ATCCGTCACACCTGCTCTGGAGAAATGATTAATACCTCCT GATCGTTAGAGCTTCTTATAATATAGCTGATAATGGTGTTG GCTCCCGTAT	91
4	ATCCGTCACACCTGCTCTAACAAATCGATGAGTGAATGTT GAACTGCTGTTTTCTTTCAAAGAAAGGCACGATGGTGTT GGCTCCCGTAT	91
5	ATCCGTCACACCTGCTCTACAATGACGACCACAATGCTCC CCCAATAACTGTGTATAAGCCGTCTCCATTGTGTGGTGTTG GCTCCCGTAT	91
6	ATCCGTCACACCTGCTCTACAATGACGACCACAATGCTCC CCCAATAACTGTGTATAAGCCGTCTCCATTGTGTGGTGTTG GCTCCCGTAT	91
7	ATCCGTCACACCTGCTCTCAGGGTTGTTTAATTCGTCTCA ACGTGACATTTGCTTGAAGGTTGAGTATGGCGGTGGTGTT GGCTCCCGTAT	91
8	ATCCGTCACACCTGCTCTTGGGAAGATCTATCGAGTTCTG GAGTGTACCGTACTGTGCATTGGCTGGTCCCATTGGTGTTG GCTCCCGTAT	91

9	ATCCGTCACACCTGCTCTTTGGCGATCATCGGTATTTTCA ATTGAAAAAATTTGTTGGAAGGCTGGGCATGCTTGGTGT GGCTCCCGTAT	91
10	ATCCGTCACACCTGCTCTGGTCAGGGACCTTTCGTCTGAA GTATAAGGTATCGCGATCCGAAGTAGTACGCAG TGGTGTGGCTCCCGTAT	91
11	ATCCGTCACACCTGCTCTGGGCTCAGGGTTGAACGCACCA AACTACGTTATATATCACTCTGATCACTATTAATGGTGTG GCTCCCGTAT	91
12	ATCCGTCACACCTGCTCTACATTTTACTGTCACCCACCA AACGTCGACGACGCTCTAATCGTCCATGATCAGTGGTGT GGCTCCCGTAT	91
13	ATCCGTCACACCTGCTCTGCGGGACTAATGTTTCATTGCGT TTAAATATCGATGGAATAAAATGGCAGTACAAGTGGTGT GGCTCCCGTAT	91
14	ATCCGTCACACCTGCTCTAAACTTCGATATTAAGAGCGAA CGATTCTGCGATTATTGTGAGTAATTATCTCCATGGTGTG GCTCCCGTAT	91
15	ATCCGTCACACCTGCTCTCGAGTAGCCAAGGGATGATCG GAAGGTGCATTAAGGTTACCGCGCCCCGTACGCATGGTGT TGGCTCCCGTAT	91

3.1.1.2. Đánh giá các ứng viên aptamer đặc hiệu với kháng nguyên *K.pneumoniae* in silico

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). Cách tiếp cận đa bước này không chỉ cho phép dự đoán và tinh chỉnh các kiểu liên kết giữa aptamer và LPS mà còn cung cấp một khung định lượng nhằm phân biệt giữa các trình tự ứng viên. Đặc biệt, phân tích CN đóng vai trò nổi bật trong toàn bộ quy trình, cung cấp một chỉ số đáng tin cậy

để xếp hạng hiệu quả liên kết của các aptamer, qua đó nhấn mạnh tính ưu việt của chiến lược in silico tích hợp được áp dụng trong nghiên cứu này.

Docking phân tử giữa các aptamer và kháng nguyên LPS của *K.pneumoniae*

Để có được những hiểu biết ban đầu về kiểu tương tác giữa các aptamer và LPS, các mô phỏng docking phân tử đã được thực hiện, và năng lượng liên kết thấp nhất của từng phức hợp aptamer–LPS được tóm tắt trong **Bảng 3.5**. Tất cả các phức hợp đều thể hiện giá trị năng lượng docking âm (dao động từ -40,2 đến -50,13 kcal/mol), cho thấy các trình tự được chọn có khả năng hình thành tương tác thuận lợi về mặt nhiệt động học với phân tử đích LPS. Kết quả này phù hợp với quá trình làm giàu thu được từ SELEX thực nghiệm trước đó, qua đó củng cố tính tin cậy của quy trình tuyển chọn aptamer trong nghiên cứu này.

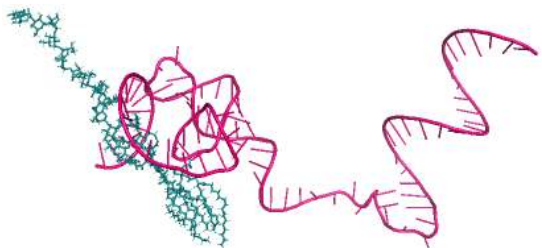
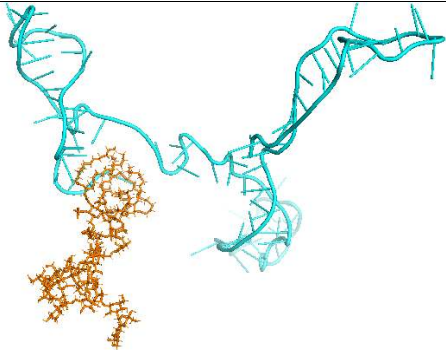
Bảng 3.5. Năng lượng docking của 15 aptamer với phân tử LPS. Đối với mỗi hệ thống, giá trị năng lượng docking thấp nhất được trình bày.

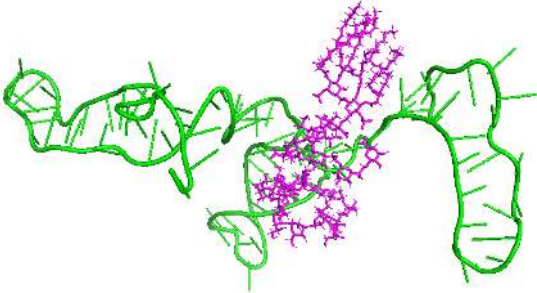
Aptamer	Năng lượng docking (kcal/mol)	Aptamer	Năng lượng docking (kcal/mol)
1	- 45.80	9	- 44.27
2	- 44.20	10	- 46.73
3	- 46.38	11	- 47.11
4	- 49.05	12	- 45.60
5	- 50.13	13	- 45.99
6	- 49.10	14	- 44.60
7	- 49.30	15	- 49.20
8	- 47.09		

Đáng chú ý, các aptamer No.5 và No.7 thể hiện giá trị năng lượng docking thấp nhất, cho thấy xu hướng liên kết ban đầu mạnh mẽ đối với LPS. Mặc dù No.9 có giá trị năng lượng docking trung bình cao hơn một chút (-44,27 kcal/mol), nhưng lại hình thành bốn liên kết hydro riêng biệt với LPS, số lượng cao nhất trong số tất cả các ứng viên. Phát hiện này cho thấy rằng độ ái lực liên kết không chỉ phụ thuộc vào năng lượng docking, mà còn bị chi phối bởi chất lượng và sự phân bố của các tương tác

phi cộng hóa trị. Aptamer No.5 cũng hình thành bốn liên kết hydro; tuy nhiên, hai trong số đó liên quan đến cùng một cặp gốc (T26 và nhóm KPLI của LPS), điều này có thể làm giảm tính đa dạng trong mạng lưới tương tác của nó so với aptamer No.9. 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. Các cấu hình docking tiêu biểu cùng các liên kết hydro của ba aptamer này được minh họa trong **Bảng 3.6**. Do đó, ba aptamer này được ưu tiên lựa chọn để đánh giá thêm thông qua mô phỏng động lực học phân tử, nhằm xem xét độ ổn định và độ bền vững của liên kết trong điều kiện động học.

Bảng 3.6. 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. Các phức hợp này được lựa chọn để thực hiện mô phỏng động lực học phân tử (MD) nhằm nghiên cứu cơ chế tương tác phân tử cơ bản giữa 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
------	---	---	---------

Mô phỏng động lực học phân tử

Sau khi thu được các cấu hình docking, nhóm nghiên cứu 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. Kết quả cho thấy, số phối trí, động học liên kết hydro và sự phân rã năng lượng tự do đã cung cấp một cái nhìn đa chiều về cơ chế nhận diện giữa aptamer và 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. Quy trình tích hợp này chính là chìa khóa giúp dung hòa các dự đoán tính toán với quan sát thực nghiệm: 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.

Bên cạnh các phân tích thực nghiệm, mô phỏng động lực học phân tử (Molecular Dynamics – MD) hiện được xem là công cụ tính toán quan trọng nhằm làm rõ cơ chế tương tác giữa aptamer và phân tử đích ở mức độ nguyên tử. Các nghiên cứu gần đây cho thấy MD không chỉ hỗ trợ xác định vị trí liên kết tiềm năng mà còn giúp dự đoán các vùng trình tự quan trọng quyết định ái lực và độ đặc hiệu của aptamer. Trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự, nồng độ aptamer tối ưu và hệ đệm phù hợp được xác định thông qua đặc điểm đỉnh dF/dT và giá trị nhiệt độ nóng chảy (T_m) trên các đường cong nóng chảy của thí nghiệm phân tích nhiệt huỳnh quang (thermofluorimetric analysis-TFA) tương ứng [120]. Giá trị T_m cao hơn được ghi nhận trong các hệ đệm có cường độ ion kim loại thấp. Phân tích docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử (MD) đã làm sáng tỏ cơ chế nền tảng của các kết quả TFA, cho thấy lực liên kết và độ ổn định của phức AP273 aptamer–AFP bị ảnh hưởng bởi số lượng vị trí gắn kết, tần suất và khoảng cách liên kết hydro, cũng như năng lượng tự do liên kết; các yếu tố này thay đổi tùy theo điều kiện hệ đệm và nồng độ ion kim loại. Bên cạnh đó, các kỹ thuật MD tăng cường (enhanced MD simulation) cũng được phát triển nhằm phân tích sâu hơn tính linh động cấu trúc và sự biến đổi

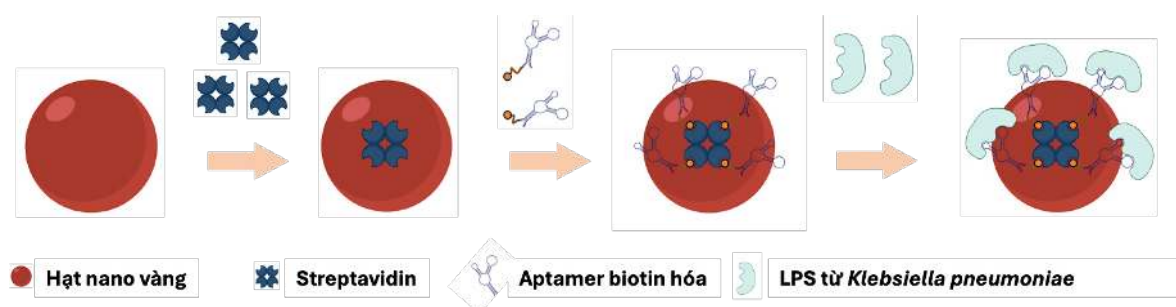
cấu dạng của RNA/DNA aptamer [121]. Cụ thể, aptamer có thể được cắt ngắn nhằm giảm chi phí tổng hợp, biến đổi hóa học để tăng khả năng kháng nuclease, làm cứng cấu trúc để thuận lợi cho nghiên cứu cấu trúc phân tử. Do đó, sự phát triển của các công cụ tính toán có khả năng cung cấp nhanh chóng và đáng tin cậy các thông tin về đáp ứng cấu trúc và động học của phân tử RNA/DNA trước những thay đổi của môi trường cục bộ - chẳng hạn như sự phân ly khỏi phân tử đối tác hoặc các biến đổi trình tự - được xem là công cụ có giá trị trong quá trình tối ưu hóa các ứng viên tiềm năng.

Điều này nhấn mạnh ưu điểm của quy trình tích hợp tính toán - thực nghiệm, vốn vượt ra ngoài mô phỏng docking tĩnh, hướng tới việc phân tích động lực học và năng lượng chi tiết hơn. Bằng cách kết hợp có hệ thống các thông số cấu trúc, năng lượng và động học, quy trình này tạo nên một khung phương pháp vững chắc cho việc sàng lọc và xác nhận aptamer. Cách tiếp cận phương pháp luận tích hợp này - nhấn mạnh tầm quan trọng của việc kết hợp các dữ liệu mô phỏng đa dạng với kiểm chứng thực nghiệm - không chỉ có giá trị đối với quá trình lựa chọn và đặc trưng hóa aptamer một cách hợp lý, mà còn có thể được áp dụng rộng rãi cho các nghiên cứu nhận diện phân tử trong nhiều hệ sinh học khác nhau.

3.1.1.3. Khảo sát ái lực liên kết của các aptamer được chọn lọc đặc hiệu với kháng nguyên *K.pneumoniae*

Kết quả SERS

Trước khi tiến hành các phép đo SERS, quá trình biến đổi bề mặt của các hạt nano vàng đã được đặc trưng hóa bằng cách theo dõi sự thay đổi thế zeta sau mỗi bước chức năng hóa (Hình 3.4).

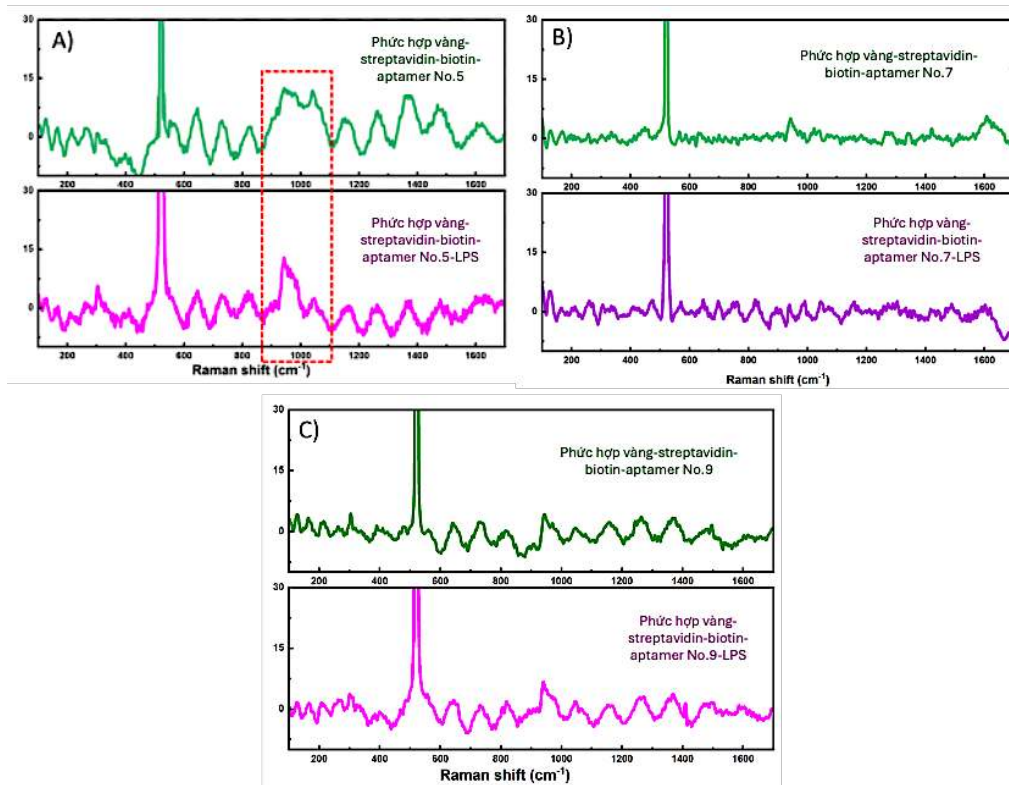


Hình 3.4. Sơ đồ minh họa quy trình liên kết trong phép đo SERS

Các hạt nano vàng (AuNPs) thể hiện thế zeta âm cao ở mức -40,15 mV, khẳng định độ bền keo tuyệt vời của chúng. Sau khi được gắn streptavidin, thế zeta dịch chuyển về phía trung tính (-17,69 mV), phù hợp với việc các ion citrate được thay thế bằng lớp protein mang điện tích gần trung hòa ở pH sinh lý. Quá trình gắn các aptamer

được biotin hóa tiếp theo làm giảm thêm giá trị thế zeta xuống -26,83 mV, -28,10 mV và -30,74 mV lần lượt đối với aptamer No.5, No.7 và No.9, phản ánh sự gắn kết của các khung xương DNA mang điện tích âm lên bề mặt hạt nano. Trong số đó, aptamer No.9 gây ra sự thay đổi rõ rệt nhất, gợi ý lớp phủ dày đặc hơn hoặc hiệu quả gắn kết cao hơn. Sau khi ủ với LPS, những thay đổi đặc trưng về điện tích bề mặt đã được quan sát thấy: aptamer No.5 và No.9 cho thấy sự giảm mạnh độ âm bề mặt (lần lượt còn -12,05 mV và -15,09 mV), cho thấy sự liên kết mạnh giữa aptamer và LPS, có khả năng gây ra hiện tượng che chắn điện tích và tái sắp xếp cấu hình tại giao diện hạt nano. Ngược lại, aptamer No.7 chỉ thể hiện sự thay đổi nhẹ (-28,10 lên -25,53 mV), cho thấy ái lực liên kết yếu hơn. Tổng thể, các kết quả này chứng minh rằng phân tích thế zeta là phương pháp hiệu quả để theo dõi từng bước biến đổi bề mặt và xác nhận quá trình nhận diện mục tiêu. Trong đó, aptamer No.9 thể hiện hiệu suất cao nhất trong cả hai giai đoạn chức năng hóa AuNPs và tương tác với LPS, tiếp theo là No.5, trong khi No.7 kém hiệu quả hơn.

Sau khi xác nhận sự thay đổi điện tích bề mặt bằng phân tích thế zeta, phép đo SERS được tiến hành nhằm hiểu sâu hơn về các tương tác ở cấp độ phân tử. SERS là phương pháp có độ nhạy cao, cung cấp thông tin phổ cho phép nhận dạng phân tử mà không cần gắn nhãn. Phương pháp này đã được chứng minh có khả năng phát hiện dấu vết của nhiều loại chất phân tích, từ ion kim loại, chất ô nhiễm đến các hợp chất phức tạp hơn như protein hoặc thậm chí là vi sinh vật [122–125]. Đặc biệt, SERS đã được sử dụng như một công cụ mạnh mẽ để phân tích aptamer và tương tác aptamer–protein, từ đó thúc đẩy khảo sát sự thay đổi phổ SERS của các chuỗi aptamer được chọn khi có sự hiện diện của LPS từ *K.pneumoniae*. Các bước liên kết trong phép đo SERS được trình bày trong **hình 3.4** và phổ SERS của ba aptamer được thể hiện trong **hình 3.5**.



Hình 3.5. Phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) của các aptamer (A) No.5, (B) No.7, (C). No.9 được lựa chọn trước và sau khi tương tác với LPS từ *K.pneumoniae*. Sự khác biệt trong phổ phản ánh những thay đổi ở cấp độ phân tử khi xảy ra liên kết giữa aptamer và LPS.

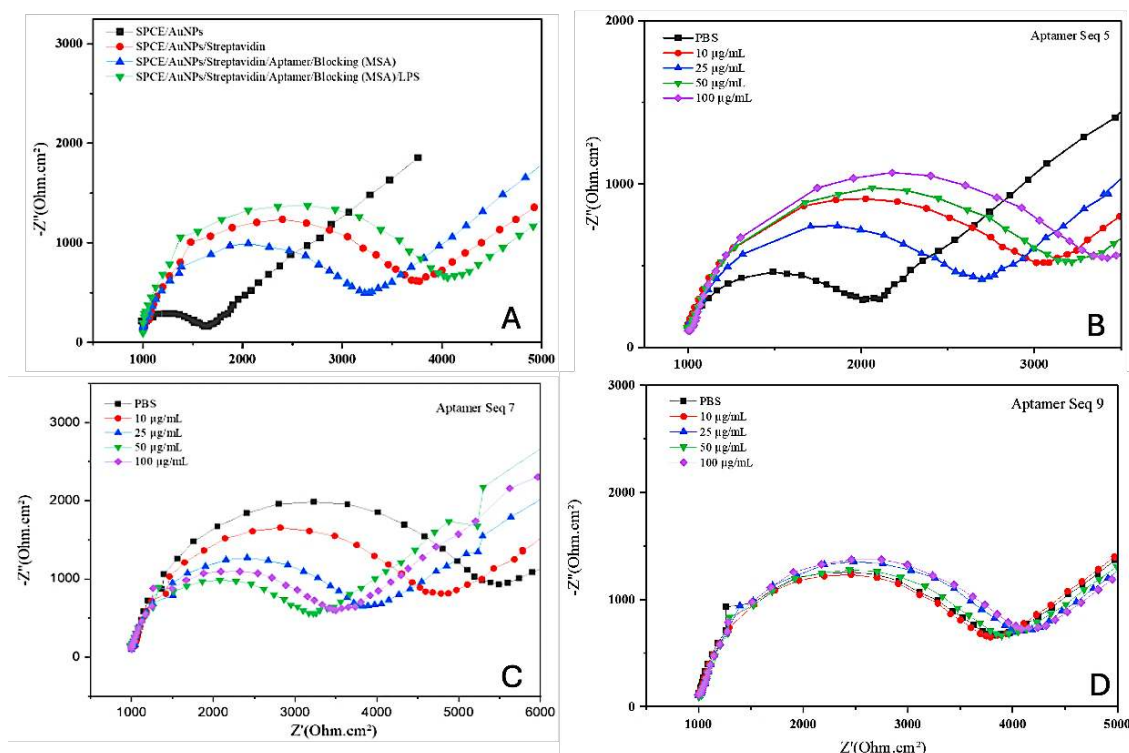
Aptamer là các phân tử DNA sợi đơn, do đó thể hiện những đặc trưng phổ SERS mạnh và điển hình của oligonucleotide. Tuy nhiên, sự khác biệt về trình tự nucleotide và thành phần base có thể dẫn đến biến thiên trong phổ SERS, vì tín hiệu phụ thuộc cao vào cấu hình phân tử của aptamer và đặc tính liên kết của nó với bề mặt kim loại được sử dụng để tăng cường tín hiệu [126]. Trong **Hình 3.5**, ba aptamer thể hiện sự khác biệt về cường độ phổ, tuy nhiên tất cả đều cho thấy các đặc trưng dao động đặc trưng của DNA. Cụ thể, các dải tại $640\text{--}646\text{ cm}^{-1}$, $724\text{--}733\text{ cm}^{-1}$ và $1360\text{--}1367\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động vòng của các base nitơ. Các dải tại $942\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, $1152\text{--}1158\text{ cm}^{-1}$, $1261\text{--}1273\text{ cm}^{-1}$, $1470\text{--}1472\text{ cm}^{-1}$ và $1606\text{--}1607\text{ cm}^{-1}$ được gán cho dao động kéo giãn của các liên kết C–C, C–N và C=C trong base, trong khi các dải tại $1042\text{--}1044\text{ cm}^{-1}$ được quy cho dao động của đường (dao động C–O và kéo giãn N–đường). Ngoài ra, các dải tại $814\text{--}826\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động của khung phosphate trong chuỗi DNA [127]. Đáng chú ý, aptamer No.7 thể hiện cường độ tín hiệu yếu hơn đáng kể tại các dải này so với No.5 và No.9. Sự suy giảm này nhiều khả năng xuất phát từ cấu trúc bậc hai và hướng gắn của nó khi được cố định thông qua liên kết streptavidin–biotin, có thể khiến các base nitơ nằm xa hơn khỏi bề mặt vàng, từ đó làm giảm hiệu ứng tăng cường hóa học.

Sau khi bổ sung LPS, sự giảm chọn lọc về cường độ của các đỉnh đặc trưng cho DNA, cùng với sự dịch chuyển nhẹ của một số đỉnh, đã được quan sát thấy, nổi bật nhất là ở aptamer No.5 (**Hình 3.5A**). Trong khoảng $856\text{--}1106\text{ cm}^{-1}$ của phổ SERS đối với các hạt nano vàng được chức năng hóa bằng aptamer No.5 thông qua liên kết streptavidin–biotin, ba đỉnh phổ chồng lấn một phần đã được phát hiện. Khi tương tác với LPS, các đỉnh này cho thấy sự giảm rõ rệt về cường độ tín hiệu. Vùng phổ này thường được gán cho các dao động của khung đường–phosphate của DNA, bao gồm dao động kéo giãn C–O/C–C của đường ribose ($\sim 930\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$) và dao động kéo giãn đối xứng của nhóm phosphate (PO_2^- , $\sim 1085\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$). Sự liên kết của No.5 với LPS có khả năng làm thay đổi hướng và sự sắp xếp không gian của các base nitơ và đoạn khung xương, khiến chúng tái định hướng so với bề mặt vàng hoặc bị che chắn bởi môi trường điện môi công kênh của LPS. Do đó, cả hiệu ứng tăng cường hóa học từ tương tác trực tiếp base–Au và hiệu ứng tăng cường điện từ tại các “điểm nóng” (hotspots) đều bị suy giảm, dẫn đến sự yếu đi của các dải đặc trưng cho DNA. Hơn nữa, do LPS chứa nhiều nhóm đường và phosphate, việc hình thành phức aptamer–LPS có thể chiếm thêm không gian xung quanh aptamer, làm giảm mật độ các điểm nóng và thay đổi hằng số điện môi cục bộ, từ đó làm gia tăng sự suy giảm tín hiệu dao động của DNA trong vùng phổ này. Tổng hợp lại, những quan sát này cho thấy các thay đổi phổ bắt nguồn từ sự hình thành đặc hiệu của phức hợp aptamer–LPS, làm biến đổi cấu hình phân tử và môi trường vi mô của aptamer trên bề mặt hạt nano vàng.

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, giúp các base nitơ của nó định hướng và tiếp cận ở vị trí thích hợp cho việc phát hiện bằng SERS. Khi aptamer thay đổi cấu hình khi gắn với phân tử đích, các đỉnh ứng với khung phosphate, base purine/pyrimidine và liên kết glycosidic dịch chuyển hoặc thay đổi cường độ - đó là dấu hiệu trực tiếp của tương tác đặc hiệu, chứ không phải hấp phụ ngẫu nhiên [128]. Những kết quả này nhấn mạnh vai trò quan trọng của trình tự nucleotit và sự tương thích về cấu hình không gian trong việc quyết định độ bền cũng như khả năng nhận biết của tương tác aptamer–đích, đồng thời khẳng định No.5 là ứng viên tiềm năng nhất cho nhận diện LPS trong hệ thống này.

Kết quả đo điện hóa đánh giá ái lực và tính đặc hiệu của aptamer

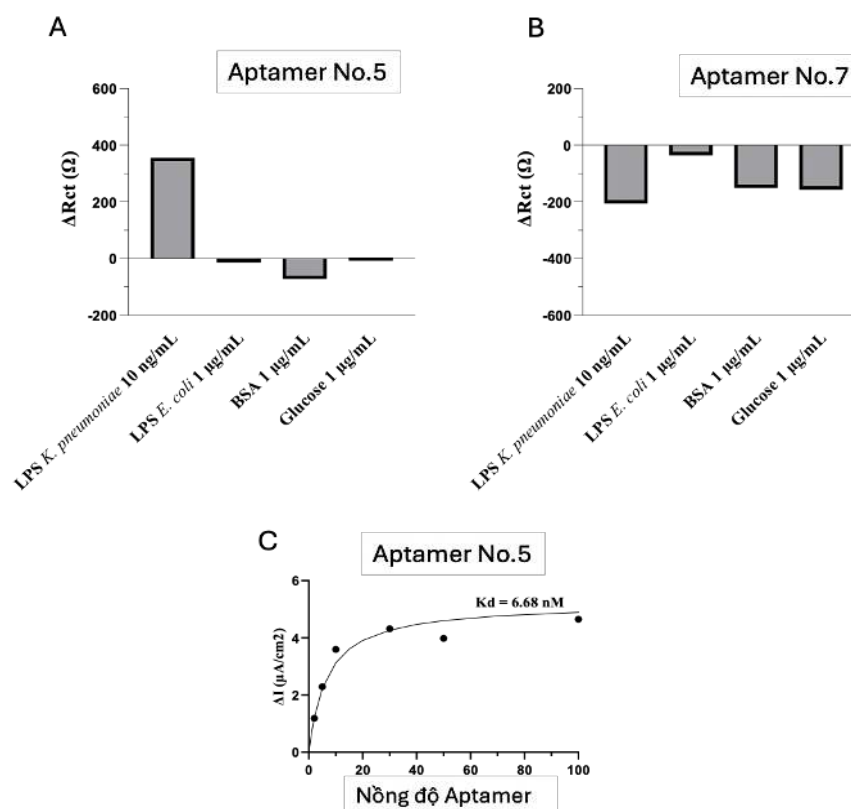
Phổ trở kháng điện hóa (EIS) là một công cụ mạnh mẽ dùng để phân tích các đặc tính bề mặt liên quan đến quá trình nhận biết sinh học xảy ra trên các bề mặt đã được biến tính, thông qua việc đo dòng điện truyền electron qua bề mặt có hoạt tính sinh học. Mô hình Randles biểu diễn một mạch điện tương đương được sử dụng rộng rãi nhằm mô tả các quá trình điện hóa tại giao diện điện cực–điện ly. Mô hình này bao gồm bốn thành phần chính: (1) R_s – điện trở dung dịch, biểu thị điện trở của dòng electron khi đi qua giao diện điện cực–điện ly; (2) C_{dl} – điện dung lớp kép, thể hiện điện dung đặc trưng tại giao diện giữa điện cực và dung dịch điện ly; (3) R_{CT} – điện trở chuyển điện tích, chịu ảnh hưởng trực tiếp bởi tương tác giữa aptamer và chất phân tích mục tiêu; và (4) Z_w – trở kháng Warburg, đại diện cho sự khuếch tán, có giá trị đáng kể khi quá trình chuyển electron bị chi phối bởi khuếch tán. Mô hình này đóng vai trò quan trọng trong phổ trở kháng điện hóa (EIS), cung cấp những thông tin chuyên sâu hữu ích cho thiết kế và đánh giá cảm biến, trong đó thông số cảm biến then chốt là R_{CT} . Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng EIS là một phương pháp đơn giản và hiệu quả để đánh giá tương tác giữa aptamer và chất đích [129][130]. Trong nghiên cứu này, điện cực carbon in sẵn phủ hạt nano vàng (AuNPs/SPCE) được sử dụng. Aptamer được cố định trên AuNPs/SPCE. Quá trình biến tính điện cực từng bước (sử dụng aptamer No.5 để đánh giá) được theo dõi bằng EIS, và kết quả được thể hiện ở **hình 3.6**. Khi biến tính SPCE/AuNPs bằng streptavidin (SA), điện trở chuyển điện tích (R_{CT}) tăng từ 0,32 k Ω lên 1,32 k Ω , cho thấy streptavidin đã được gắn thành công lên bề mặt điện cực AuNPs/SPCE. Sự tăng này là do streptavidin tạo nên một lớp màng cách điện, làm giảm khả năng dẫn điện của bề mặt điện cực [131]. Tiếp theo, aptamer gắn biotin được cố định trên bề mặt thông qua tương tác đặc hiệu giữa biotin và streptavidin, sau đó bề mặt được chặn lại bằng acid mercaptosuccinic (MUA). Đáng chú ý, việc bổ sung MSA gây ra sự giảm nhẹ điện trở chuyển điện tích, thể hiện qua việc R_{CT} giảm từ 1,32 k Ω xuống 1,06 k Ω . Để khảo sát hoạt động của điện cực đã gắn aptamer, mẫu được tiếp xúc với dung dịch LPS trong PBS 1X ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$. Khi đó, giá trị R_{CT} tăng từ 1,06 k Ω lên 1,50 k Ω , cho thấy sự gắn kết của LPS. Sự thay đổi tuần tự của R_{CT} chứng minh quá trình lắp ráp lớp cảm biến từng bước được thực hiện thành công và sự nhận biết đặc hiệu LPS bởi aptamer No.5 (**Hình 3.6A**).



Hình 3.6. (A) Sơ đồ cơ chế của phép đo phổ trở kháng điện hóa. Đồ thị Nyquist của điện cực AuNPs/SPCE được ghi lại trong dung dịch 0,1 M KCl có chứa 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ tại thế hở mạch (OCP), trong dải tần số từ 50 mHz đến 100 kHz với biên độ dao động AC là 10 mV AuNPs/SPCE. (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 *K.pneumoniae* (10, 25, 50 và 100 μg/mL), thể hiện đáp ứng trở kháng phụ thuộc vào nồng độ.

Hệ thống này sau đó được sử dụng để khảo sát độ ái lực liên kết (binding affinity) của từng trình tự aptamer được chọn với LPS từ *K.pneumoniae* ATCC bằng cách cho các điện cực đã cố định aptamer tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của LPS trong dung dịch đệm 1× PBS. Như dự đoán, 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 (**Hình 3.6B, C**). Ngược lại, đáp ứng trở kháng của No.9 hầu như không thay đổi khi có mặt LPS (**Hình 3.6D**), 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. Điều này khẳng định No.5 là ứng viên aptamer tiềm năng nhất cho việc phát triển cảm biến sinh học. Đáng chú ý, các giá trị ΔR_{CT} thể hiện xu hướng trái

ngược nhau giữa aptamer No.5 và No.7 sau khi tiếp xúc với LPS. Đối với aptamer No.5, ΔR_{CT} dương được ghi nhận, có thể giải thích do sự hình thành phức hợp aptamer–LPS bền vững trên bề mặt điện cực, cản trở quá trình truyền điện tích của chất oxi hóa–khử, từ đó làm tăng điện trở giao diện. Ngược lại, aptamer No.7 lại thể hiện ΔR_{CT} âm, tức là giảm điện trở truyền điện tích sau khi gắn kết với LPS. Hành vi không điển hình này có thể bắt nguồn từ sự tái sắp xếp cấu trúc bề mặt do tương tác aptamer–LPS gây ra, làm thay đổi cấu trúc giao diện theo hướng thuận lợi hơn cho quá trình truyền điện tử. Ngoài ra, điện tích âm mạnh của LPS cũng có thể trung hòa hoặc phân bố lại điện tích tại giao diện điện cực khi có mặt aptamer No.7, qua đó giảm hàng rào tĩnh điện đối với cặp oxi hóa–khử $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Những khác biệt này được giải thích rõ hơn thông qua phân tích động lực học phân tử (MD). Aptamer No.5 được phát hiện hình thành các liên kết hydro ổn định với LPS, bao gồm T26–KPLI (hai liên kết), T24–KPLI và G5–BGA6, tạo nên các điểm neo bền vững cho phức hợp, tương ứng với sự tăng trở kháng ổn định trong EIS. Trong khi đó, No.7 chủ yếu hình thành liên kết hydro với các gốc T61–AHE4, G60–BGL5 và T44–AKD12, cho thấy tương tác yếu hoặc kém ổn định hơn, phù hợp với hiện tượng giảm ΔR_{CT} đã quan sát được.



Hình 3.7. Tính chọn lọc của các điện cực AuNPs/SPCE được cố định aptamer No.5 (A) và No.7 (B) đối với các chất phân tích khác nhau, bao gồm LPS từ *E. coli* (1 μ g/mL), BSA (1 μ g/mL), glucose (1 μ g/mL) và LPS từ *K.pneumoniae* (10 ng/mL). Các biểu đồ cột minh họa sự thay đổi điện trở chuyển điện tử (ΔR_{CT}) được tính toán từ phổ trở kháng điện hóa faradaic. (C) Hằng số phân ly (K_d) của aptamer No.5 được xác định từ sự thay đổi cường độ dòng đỉnh (ΔI) đo bằng phương pháp Volt-ampe xung vi phân (DPV), dựa trên phương trình hồi quy phi tuyến.

Tổng hợp lại, các kết quả này cho thấy aptamer No.5 hình thành các tương tác phân tử thuận lợi hơn với LPS, dẫn đến tín hiệu điện hoá ổn định và đáng tin cậy, trong khi aptamer No.7 thể hiện hành vi gắn kết kém ổn định, làm suy giảm tiềm năng của nó như một phần tử nhận biết trong cảm biến sinh học. Ngoài ra, phản ứng EIS gần như không thay đổi của aptamer No.9 khi tăng nồng độ LPS phù hợp với kết quả mô phỏng động lực học phân tử (MD), trong đó chỉ ghi nhận mạng lưới liên kết hydro thưa thớt và yếu, bao gồm T29–BGA16, G57–BGL11, G58–AGA10, và G61–AKD2. Các liên kết này phân bố rải rác dọc theo cấu trúc aptamer và có xu hướng xuất hiện ở vùng ngoại vi của O-antigen hoặc lõi polysaccharide, dẫn đến mức năng lượng liên kết nông và độ linh động cấu dạng cao. Những tương tác yếu và thoáng qua này ngăn cản sự hình thành lớp che phủ đặc hoặc sự tiếp cận gần giữa LPS và bề mặt điện cực,

do đó không cản trở đáng kể quá trình truyền điện tích của cặp oxi hóa–khử $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Kết quả là ΔR_{CT} và các thông số giao diện khác gần như không thay đổi. Nói cách khác, aptamer No.9 chỉ gắn kết với LPS một cách yếu và tạm thời, tạo ra mật độ phủ bề mặt thấp và ít ảnh hưởng đến quá trình truyền điện tích, điều này giải thích cho đường đáp ứng EIS phẳng và khẳng định rằng aptamer No.9 không phải là ứng viên phù hợp cho phát hiện LPS nhạy.

Để đánh giá thêm tính đặc hiệu của các aptamer đối với LPS, nhóm nghiên cứu đã khảo sát phản ứng của chúng với các chất gây nhiễu tiềm năng, bao gồm LPS từ *E. coli*, BSA và glucose, mỗi chất ở nồng độ cao gấp 100 lần so với LPS từ *K.pneumoniae*. Kết quả cho thấy aptamer No.5 thể hiện phản ứng rất nhỏ với các chất không đặc hiệu, được phản ánh qua sự thay đổi ΔR_{CT} không đáng kể (**Hình 3.7A**). Ngược lại, aptamer No.7 thể hiện độ ái lực thấp với LPS từ *E. coli* nhưng lại cho đáp ứng cao bất thường đối với BSA và glucose (**Hình 3.7B**), với giá trị ΔR_{CT} âm. Điều này chỉ ra rằng tín hiệu EIS của No.7 chủ yếu bắt nguồn từ tương tác không đặc hiệu và các hiệu ứng môi trường, thay vì từ liên kết đặc hiệu với LPS đích. Cụ thể, BSA – một protein mang điện tích âm (điểm đẳng điện $\text{pI} = 4.7$) – có thể hấp phụ lên bề mặt điện cực đã cố định aptamer, gây tái sắp xếp môi trường điện tích cục bộ, từ đó giảm lực đẩy tĩnh điện đối với cặp oxi hóa–khử $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ và làm giảm điện trở giao diện. Glucose, ở nồng độ cao, có thể thay đổi hằng số điện môi và độ nhớt của dung dịch, đồng thời hình thành các liên kết hydro yếu với các base hoặc nhóm phosphate lộ ra của aptamer, cũng như với giao diện streptavidin/biotin, từ đó gây ra sự tái tổ chức bề mặt thuận lợi cho quá trình truyền điện tử. Ngược lại, các motif O-antigen và lõi polysaccharide đặc trưng của LPS từ *E. coli* không tương thích với vùng nhận biết của aptamer No.7, phù hợp với kết quả mô phỏng MD cho thấy mạng lưới liên kết hydro thưa thớt và thiếu tương tác hiệp đồng, dẫn đến độ bền liên kết thấp. Các kết quả này chỉ ra rằng aptamer No.7 nhạy cảm hơn với hiện tượng bám protein và các hiệu ứng bề mặt do dung dịch gây ra hơn là với nhận biết đặc hiệu của LPS, do đó hạn chế khả năng ứng dụng của nó như một đầu dò cảm biến đáng tin cậy.

Để mô tả độ mạnh của ái lực liên kết giữa aptamer No.5 và LPS, hằng số phân ly (K_d) của aptamer được tính toán dựa trên sự thay đổi cường độ dòng đỉnh (ΔI), được đo bằng phương pháp Volt-ampe xung vi phân (DPV). Giá trị K_d được xác định

bằng cách khớp dữ liệu thực nghiệm theo mô hình hấp phụ đẳng nhiệt Langmuir. Kết quả cho thấy aptamer No.5 có ái lực liên kết cao với giá trị $K_d = 6,68$ nM (**Hình 3.7C**). Giá trị này tương đương với các kháng thể có ái lực cao, vốn thường thể hiện giá trị K_d trong khoảng nanomol đối với các phân tử đích kích thước nhỏ [132]. So với các aptamer được chọn lọc cho LPS từ *E. coli* O55:B5 bằng phương pháp NECEEM không dựa trên SELEX, giá trị K_d của Seq 5 cũng thể hiện mức độ tương đương [133]. Đáng chú ý, aptamer có ái lực cao nhất được báo cáo trước đó ($K_d = 12$ nM) đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để phát triển cảm biến sinh học với giới hạn phát hiện (LOD) đạt đến 1 pg/mL LPS, cho thấy rằng aptamer No.5 trong nghiên cứu này có tiềm năng rất lớn trong việc phát triển các cảm biến aptamer (aptasensor) có độ nhạy và độ chọn lọc cao.

Ban đầu, thư viện ssDNA được thiết kế với vùng ngẫu nhiên dài 55 nucleotide (N55) nhằm đảm bảo sự cân bằng giữa đa dạng trình tự, khả năng hình thành cấu trúc không gian phức tạp và khả năng thao tác thực nghiệm thuận lợi nhằm tăng hiệu suất chọn lọc SELEX [134]. Năm 2016, nhóm nghiên cứu của Kim và cộng sự đã đăng ký bằng sáng chế KR101605846B1 chọn lọc aptamer đặc hiệu cho *K.pneumoniae* chủng KCTC2208 sử dụng kỹ thuật Whole-Cell SELEX. Với kỹ thuật này, aptamer cho thể gắn với bất kỳ epitope bề mặt nào, và rất khó kiểm soát phản ứng chéo với các chủng Gram âm khác có bề mặt tương tự. Với nghiên cứu trên kháng nguyên LPS của *K.pneumoniae*, aptamer được chọn lọc bằng kỹ thuật SELEX kết hợp với docking phân tử, mô phỏng động lực học phân tử cho phép truy vết phân tử đặc hiệu (xác định lipid A vs O-antigen với lỗi), phù hợp hơn cho chẩn đoán nội độc tố. Đặc biệt, LPS này có nguồn gốc từ *K.pneumoniae* ATCC 15380 thuộc typ huyết thanh K1, kháng nguyên O1, trong đó ở Việt Nam, typ huyết thanh K1 chiếm khoảng 19,2% và thường là chủng siêu độc; chủng mang kháng nguyên O1 chiếm tới 77% chủng *K.pneumoniae* độc lực cao [135]; điều này cho thấy luận án đã lựa chọn kháng nguyên phù hợp cho sàng lọc aptamer giám sát các chủng độc lực và phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên, việc chọn lọc aptamer dựa trên kháng nguyên LPS thương mại cũng tồn tại nhiều hạn chế. Một thách thức lớn trong quá trình SELEX đối với LPS là tính dị thể cấu trúc (heterogeneity) của LPS thương mại. LPS thương mại không tồn tại dưới dạng một phân tử đồng nhất mà là hỗn hợp gồm nhiều phân tử chứa O-antigen có tính

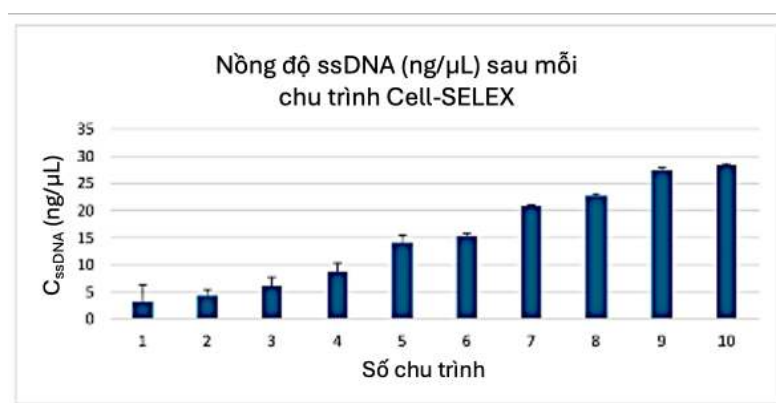
đa dạng cao, dẫn đến hiện tượng tuyển chọn phân tán thay vì tập trung vào một vị trí nhận diện đặc hiệu, khiến aptamer có khả năng nhận diện chéo giữa các chủng vi khuẩn Gram âm khác nhau. Chính vì vậy, trong bằng sáng chế WO2022169890A1 của Tao Jiang năm 2022, quá trình chọn lọc đã sử dụng thêm lipoteichoic acid (LTA) làm đích dung để chọn lọc đối kháng nhằm loại bỏ các aptamer có khả năng liên kết không đặc hiệu với các cấu trúc bảo tồn phổ biến trên vi khuẩn. Điều này cho thấy việc thiết kế chiến lược counter-SELEX phù hợp đóng vai trò đặc biệt quan trọng nhằm nâng cao độ đặc hiệu của aptamer đối với từng loài hoặc từng nhóm vi khuẩn mục tiêu. Một hạn chế đáng chú ý nữa trong quá trình chọn lọc aptamer kháng LPS là sự khác biệt giữa LPS tinh sạch *in vitro* và trạng thái tồn tại tự nhiên của LPS *in situ* trên bề mặt vi khuẩn sống. LPS thương mại tinh khiết không thể tái hiện đầy đủ tổ chức không gian của LPS trên màng ngoài vi khuẩn, bao gồm mật độ phân bố, sự neo giữ của lipid A trong lớp lipid kép cũng như các tương tác với protein màng ngoài (outer membrane proteins – OMPs) lân cận. Vì vậy, aptamer được chọn lọc hiệu quả trên LPS tinh sạch có thể chưa chắc có khả năng nhận diện vi khuẩn sống trong điều kiện thực tế.

Trong nghiên cứu này, một quá trình khảo sát toàn diện kết hợp giữa mô phỏng tính toán và thí nghiệm thực nghiệm đã được tiến hành nhằm hiểu rõ cơ chế và lựa chọn được aptamer có ái lực tốt nhất đối với LPS. Trước hết, quy trình SELEX truyền thống được thực hiện, thu được 15 trình tự ssDNA tiềm năng sau 10 vòng tuyển chọn. Tiếp theo, các cấu trúc ba chiều của những trình tự này và phân tử LPS được xây dựng để thực hiện phân tích docking, từ đó chọn ra các ứng viên tốt nhất cho nghiên cứu động lực học phân tử (MD) và xác minh bằng thí nghiệm thực nghiệm. Ba ứng viên được chọn là aptamer No.5 và No.7 (có năng lượng docking cao nhất) và aptamer No.9 (có số lượng liên kết hydro cao nhất, tương đương với No.5). Trong nghiên cứu mô phỏng tính toán, kết quả động lực học phân tử cho thấy aptamer No. 5 có tương tác liên kết bền vững và ổn định nhất. Mặc dù aptamer No.7 có điểm docking cao hơn No.9, nhưng lại kém ổn định hơn đáng kể trong mô phỏng, gợi ý rằng một aptamer tốt cần đồng thời có điểm docking cao và số lượng liên kết hydro lớn để đạt được khả năng nhận diện đặc hiệu cao với đích. Về mặt thí nghiệm, các kỹ thuật như phổ tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) và phổ trở kháng điện hóa (EIS) đã được sử

dụng để đánh giá đặc tính liên kết của ba aptamer được chọn với LPS. Kết quả thực nghiệm phù hợp chặt chẽ với mô phỏng, khi aptamer No.5 thể hiện ái lực và độ chọn lọc cao nhất đối với LPS. Sự tương đồng giữa kết quả mô phỏng và thực nghiệm đã khẳng định tính hiệu quả của phương pháp mô phỏng tính toán được áp dụng, đồng thời đề xuất tiềm năng của phương pháp này như một công cụ hỗ trợ hoặc thay thế khả thi cho các phương pháp thí nghiệm trong quá trình tuyển chọn aptamer đặc hiệu kết hợp đánh giá khả năng nhận diện của aptamer trên vi khuẩn sống, mẫu lâm sàng và môi trường phức tạp nhằm tối ưu hóa trình tự aptamer, nâng cao độ đặc hiệu và độ ổn định của hệ thống phát hiện.

3.1.2. Chọn lọc aptamer cho trực khuẩn *P.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 3.8).



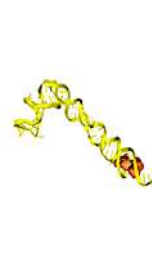
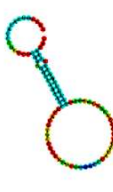
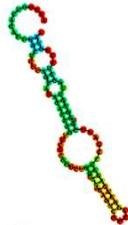
Hình 3.8. Biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ ssDNA qua các vòng SELEX toàn tế bào đối với *P. aeruginosa*. Nồng độ ssDNA được xác định bằng quang phổ kế Nanodrop; xu hướng tăng dần phản ánh quá trình làm giàu dần các trình tự có ái lực cao với tế bào mục tiêu.

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. Hình ảnh tách dòng được trình bày trong phần phụ lục. 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 [136,137] và đánh giá ái lực liên kết phân tử bằng HDock

[138] với vùng LPS trên bề mặt của *P. aeruginosa*. Vùng lipopolysaccharide (LPS) trên bề mặt của *P. aeruginosa*, đặc biệt là kháng nguyên polysaccharide chung (CPA) nằm ở đầu tận cùng của phân tử LPS, đóng vai trò là đích liên kết chính của các aptamer. Điều này là do chủng *P. aeruginosa* VTCC 12273 (còn được biết đến với tên ATCC 27853) biểu hiện CPA nhưng thiếu kháng nguyên đặc hiệu O (OSA) do mất một số gen cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp OSA [139]. Sự thiếu vắng OSA khiến CPA trở thành epitope duy nhất có thể tiếp cận trên bề mặt tế bào, qua đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc tuyển chọn các aptamer đặc hiệu với CPA.

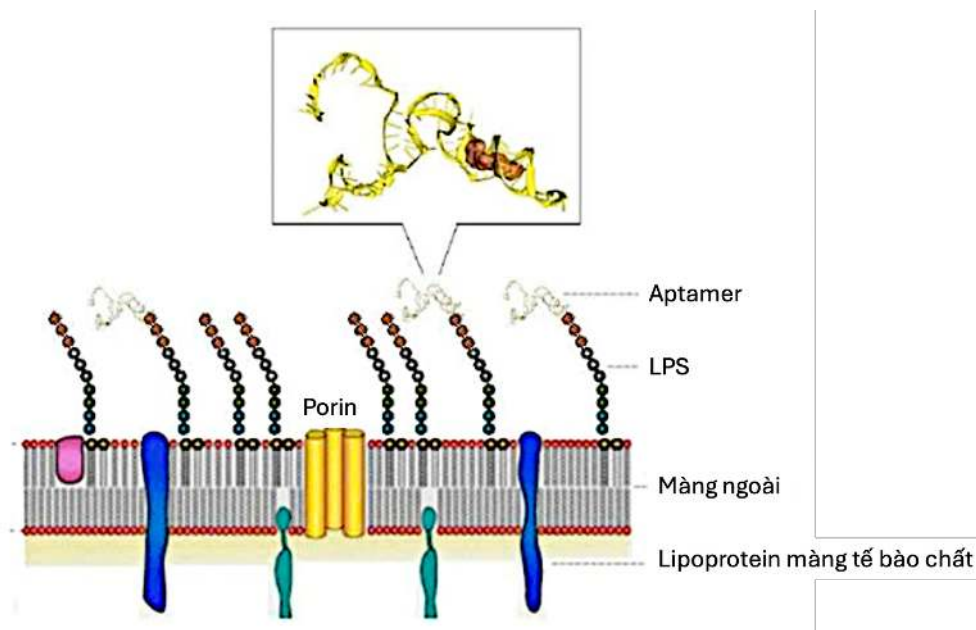
Chi tiết của quá trình tuyển chọn aptamer — bao gồm điểm docking, mô hình cấu trúc 2D/3D và hình ảnh tương tác docking — được trình bày trong **Bảng 3.7**. Năng lượng tự do tối thiểu (MFE, ΔG) đề cập đến giá trị năng lượng tự do dự đoán thấp nhất. Mô hình MFE biểu thị cấu trúc bậc hai (2D) của aptamer, được tạo ra bằng cách tối đa hóa số lượng liên kết base bổ sung nhằm đạt được trạng thái năng lượng tự do tối thiểu. Tần suất (Frequency) biểu thị tỷ lệ phần trăm của một dạng cấu hình aptamer nhất định tồn tại trong môi trường. Ví dụ, dạng MFE của aptamer T1 có tần suất xuất hiện là 24,98%, nghĩa là khoảng 25 trong mỗi 100 phân tử aptamer tồn tại ở cấu hình này tại một thời điểm nhất định. Điểm đa dạng (Diversity score) được tính dựa trên phân bố entropy của từng trình tự aptamer. Giá trị entropy cao hơn phản ánh mức độ bất ổn định cấu trúc lớn hơn và do đó thể hiện sự đa dạng cao hơn. Điểm số này đại diện cho mức độ biến thiên cấu trúc tổng thể trong tất cả các cấu hình được dự đoán của một trình tự aptamer. Điểm docking (Docking score) biểu thị sự thay đổi năng lượng liên kết khi aptamer tương tác với phân tử LPS [140].

Bảng 3.7. Đặc tính của sáu 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-GGTCTTAGCATAACGGTATAAGCCGTAAACGGTTTACCTAAACTGGTGTGGCTCCCGTAT	-453.85	-27.10	24.98	4.64			
T2	ATCCGTCACACCTGCTCTCAAGGTCATA-GGGGCTTCTTGGCAGCGTAATGCCCTTGC-TGCAITTTTCCCTCATGGTGTGGCTCCCGTAT	-366.23	-22.11	3.82	28.74			
T3	ATCCGTCACACCTGCTCTCATCATGCC-CGCGTTCTAATAACTGCTATATCCTTTAT-CGCCCTCTATCCCTCCGTTGGTGTGGCTCCCGTAT	-409.72	-12.20	8.83	13.74			
T4	ATCCGTCACACCTGCTCTGAGACTAGCA-GTTTTTAACCAGAGTAAATAACTCCCTCT-TCCATAAAATTCCTCCGTTGGTGTGGCTCCCGTAT	-427.08	-15.86	21.23	8.54			
T5	ATCCGTCACACCTGCTCTCGGTGGTCAGC-ATCTCACTTGCCTTCTGCTGACCTATCCA-TCCCTCGTCGTCATGGTGTGGCTCCCGTAT	-373.65	-18.11	1.15	19.52			
T6	ATCCGTCACACCTGCTCTCAGTATACAC-CGTTCTCCGCTCTGGTCTACAGTCCCCCGG-CTGAGCCCCTATTCTGGTGTGGCTCCCGTAT	-378.06	-18.83	5.12	22.07			

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*. Aptamer T1 chủ yếu hình thành mô típ thân–vòng (stem–loop) cổ điển và vẫn duy trì

được cấu trúc tự nhiên của nó khi gắn với kháng nguyên, trong khi các aptamer khác cho thấy sự biến dạng cấu trúc đáng kể và dịch chuyển vị trí kháng nguyên. Những đặc tính này xác định T1 là ứng viên tiềm năng nhất cho các nghiên cứu tiếp theo, bao gồm cộng hợp với hạt vàng nano (AuNPs) và phát hiện *P. aeruginosa*. Mô hình tương tác docking giữa aptamer T1 và đích CPA (thuộc phân tử LPS) được thể hiện trong **Hình 3.9**.



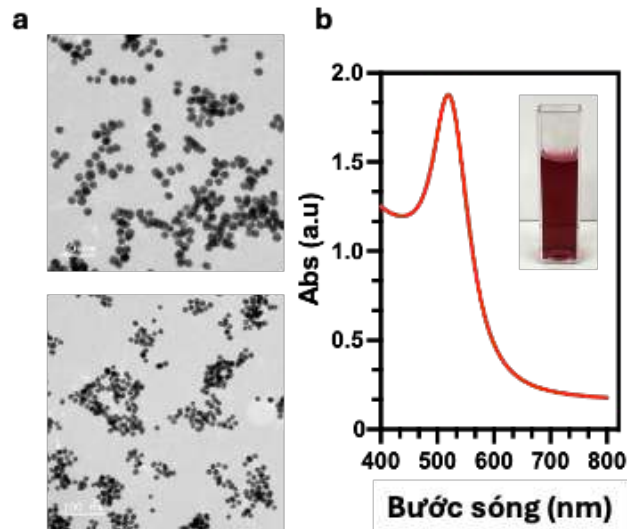
Hình 3.9. Mô hình tương tác docking giữa aptamer T1 và kháng nguyên CPA (thuộc LPS) trên bề mặt *P. aeruginosa*.

Việc lựa chọn mục tiêu là toàn bộ tế bào vi khuẩn thông qua kỹ thuật whole-cell SELEX có ưu điểm quan trọng là cho phép aptamer nhận diện các cấu trúc đích trong trạng thái tự nhiên trên bề mặt tế bào mà không cần tách chiết hoặc tinh sạch riêng lẻ kháng nguyên. Điều này giúp duy trì cấu hình không gian và tính sinh học tự nhiên của CPA trên màng ngoài vi khuẩn, từ đó làm tăng khả năng thu được các aptamer có ái lực và độ đặc hiệu cao trong điều kiện thực tế [141]. Bên cạnh đó, CPA được xem là mục tiêu phù hợp cho việc phát triển aptamer phát hiện *P. aeruginosa* vì đây là cấu trúc có tính bảo tồn cao hơn so với O-specific antigen (OSA), vốn thay đổi giữa các typ huyết thanh. Nghiên cứu của Hao và cộng sự cho thấy CPA là một thành phần LPS phổ biến và đóng vai trò quan trọng trong tương tác của vi khuẩn với tế bào biểu mô đường hô hấp người [142]. Chính tính bảo tồn này giúp aptamer hướng đích CPA có khả năng nhận diện nhiều chủng *P. aeruginosa* khác nhau, làm tăng tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng. Tuy nhiên, việc sử dụng chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853 trong quá trình chọn lọc có thể làm hạn chế khả năng bao phủ đối với các chủng lâm sàng đa dạng, khi nhiều nghiên cứu cho thấy các typ huyết

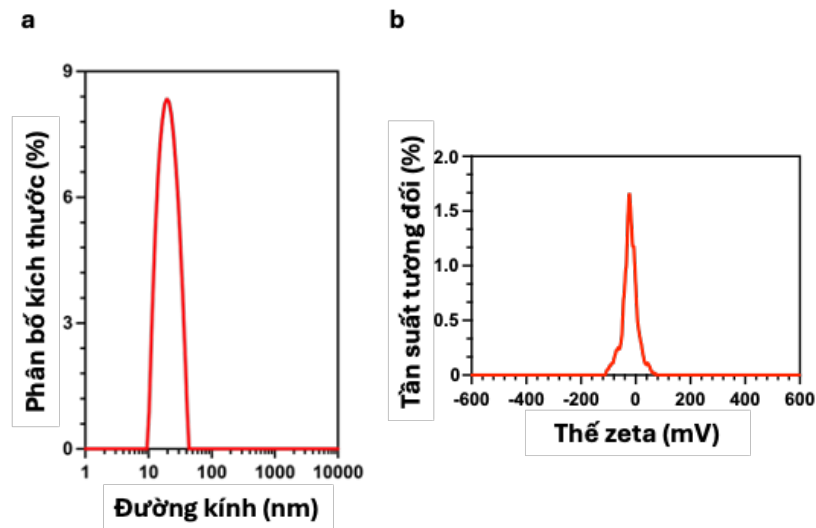
thanh O6 và O11 là những typ lưu hành phổ biến của *P.aeruginosa* [143]. Cấu trúc LPS và các thành phần bề mặt của *P. aeruginosa* có thể thay đổi giữa các typ huyết thanh, trạng thái sinh trưởng hoặc điều kiện môi trường khác nhau, từ đó ảnh hưởng đến khả năng nhận diện của aptamer trên các chủng thực tế [144]. Ngoài ra, nghiên cứu chưa khảo sát sâu động học liên kết và hằng số phân ly (K_d) của aptamer trên nhiều chủng lâm sàng khác nhau, do đó vẫn cần thêm các nghiên cứu mở rộng để đánh giá toàn diện tính đặc hiệu và độ nhạy trong điều kiện ứng dụng thực tế.

3.2. Khảo sát tính chất của hạt nano vàng

Các hạt nano vàng đã được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau dựa trên tính tương thích sinh học và nhiều chức năng bề mặt của chúng [145]. Một trong những kỹ thuật nổi tiếng nhất để tổng hợp AuNP là dựa trên việc khử HAuCl_4 bằng citrate trong nước, được sử dụng trong nghiên cứu này [114]. Các hạt AuNP dạng keo đã được tổng hợp thành công trong huyền phù đơn phân tán bằng phương pháp khử citrate tiêu chuẩn. Phương pháp khử citrate có thể tạo ra các hạt nano vàng có kích thước khác nhau tùy thuộc vào tỷ lệ mol của trisodium citrate dihydrate với axit tetrachloroauric [146]. Hơn nữa, các hạt AuNP thể hiện các mức độ hoạt động tương tự enzyme peroxidase khác nhau đối với TMB, theo đó kích thước càng nhỏ thì hoạt tính xúc tác càng cao [147]. 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 (**Hình 3.11A**) và ảnh TEM (**Hình 3.10A**). Phổ hấp thụ UV-Vis của AuNP có đỉnh đặc trưng ở ~ 520 nm (**Hình 3.10B**), và thế zeta là $-21,85$ mV (**Hình 3.11B**). Các nghiên cứu đã báo cáo rằng các vật liệu tích điện âm có lợi cho quá trình oxy hóa chất nền cation TMB [148]. Do đó, 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 3.10. Hình ảnh TEM với thang đo 50 nm, 100 nm (a) và phổ UV-Vis trong phạm vi bước sóng từ 400 đến 800 nm của hạt AuNP (b).



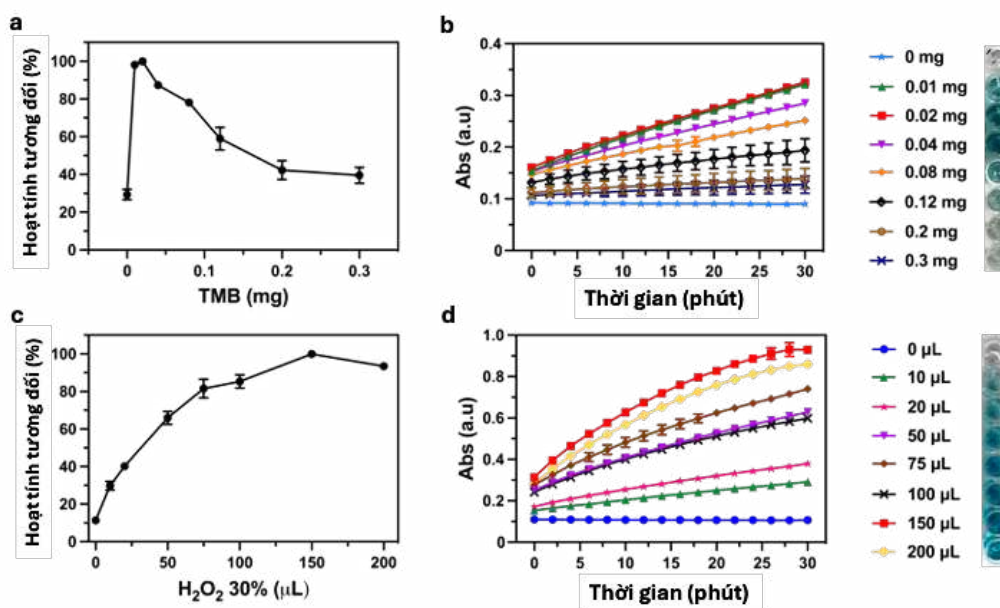
Hình 3.11. Các phép đo tán xạ ánh sáng động (DLS) cho đường kính thủy động của các hạt nano vàng (a) Điện thế Zeta của các hạt nano vàng (b).

3.3. Phát triển kỹ thuật ELISA trực tiếp phát hiện *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa*

3.3.1. Các điều kiện tối ưu của hoạt động nanozyme

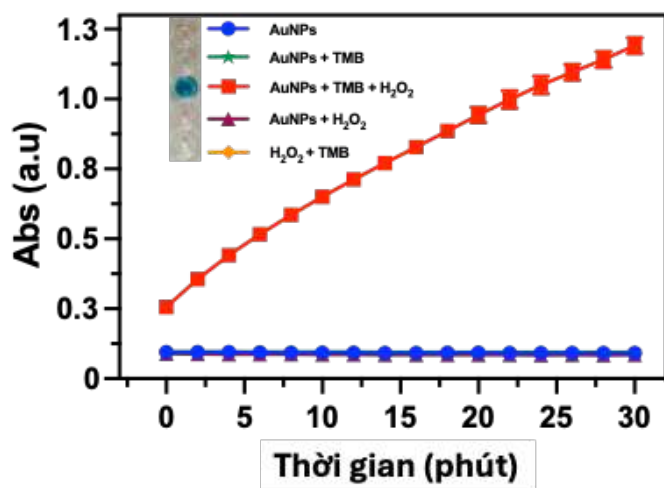
Các hạt nano vàng được khảo sát như một chất xúc tác peroxidase và TMB như một chất nền có thể tạo ra màu xanh lam trong H_2O_2 . Đối với phát hiện màu, các chất nền mong muốn nhất nhanh chóng tạo ra các sản phẩm phản ứng có màu đậm. Khi lượng chất phân tích trải dài trên một dải nồng độ rộng (dải động lớn), thì việc sử dụng các chất nền tạo ra màu trong thời gian dài hơn (15 đến 30 phút) sẽ phù hợp hơn

vì khi đó, người ta có thể phát hiện ra dải cường độ màu rộng hơn phụ thuộc vào chất phân tích [149]. Trong trường hợp này, thời gian phản ứng được chọn là 30 phút trong tất cả các thí nghiệm. **Hình 3.12A,C** chứng minh rằng hoạt động của nanozyme đạt hiệu suất cao nhất ở 0,02 mg TMB và 150 μL H_2O_2 30%, vì màu xanh lam mạnh nhất tại các điểm đó sau 30 phút ủ. Các hoạt động giảm khi nồng độ TMB tăng; tuy nhiên, thể tích H_2O_2 càng cao thì tín hiệu nanozyme đo được càng lớn. Có thể giải thích rằng việc tăng liên tục nồng độ TMB có thể ức chế hoạt động của nanozyme.



Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ TMB (a, b) và H_2O_2 (c, d) lên hoạt tính của nanozyme trong 30 phút (a, c) và trong vòng 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm (b, d). Các nồng độ khác nhau của TMB và H_2O_2 được trình bày lần lượt trong (b) và (d).

Mặt khác, tín hiệu nanozyme được nâng cao cho đến khi nồng độ H_2O_2 30% đạt 100 μL . Các phản ứng tiếp tục theo chu trình khử và oxy hóa, chỉ xảy ra ở lượng TMB đủ lớn theo tỷ lệ nồng độ nanozyme và H_2O_2 nhất định (**Hình 3.12A**). Tín hiệu phản ứng của nghiên cứu động học về quá trình oxy hóa xúc tác TMB tăng dần khi đo trong vòng 30 phút (**Hình 3.12B,D**). Kết quả là, 0,02 mg TMB và 150 μL H_2O_2 30% được chọn cho tất cả các thí nghiệm sau đó.



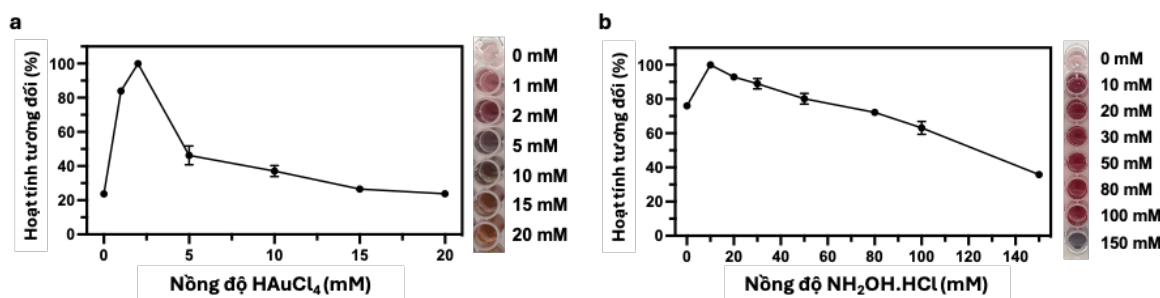
Hình 3.13. Đánh giá hoạt tính nanozyme khi có mặt TMB và H₂O₂, đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm. Các thí nghiệm được tiến hành trên năm nhóm: chỉ AuNP, AuNP + TMB, AuNP + TMB + H₂O₂, AuNP + H₂O₂ và H₂O₂ + TMB. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn của ba phép đo lặp lại.

AuNP có hoạt tính bắt chước peroxidase đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây [150,151]. **Hình 3.13** tái hiện quan sát trực quan thời gian thực của phản ứng trong 30 phút. Hỗn hợp AuNP và TMB, AuNP và H₂O₂, H₂O₂ và TMB không màu, cho thấy AuNP không thể xúc tác quá trình oxy hóa TMB khi không có H₂O₂; do đó, không quan sát thấy sự hấp thụ ở 650 nm. Dữ liệu chứng minh rằng sự hình thành màu xanh do quá trình oxy hóa chất nền TMB chỉ xuất hiện dưới sự tác động đồng thời của nanozyme và H₂O₂, điều này khẳng định chắc chắn hoạt động của nanozyme như một chất xúc tác.

3.3.2. *Quá trình tối ưu hóa việc tăng cường nhuộm màu*

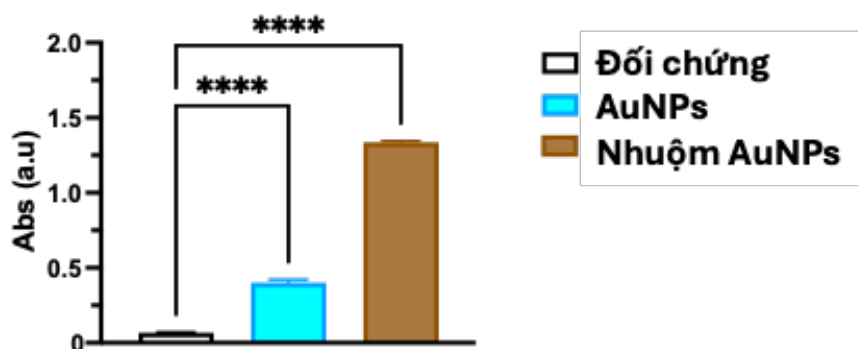
Cho đến nay, một số loại hạt nano đã được phát hiện là giống hoạt tính enzyme peroxidase, được biến đổi để tăng cường hoạt động xúc tác, bao gồm cysteamine-AuNPs [152], chitosan-AuNPs [153], BSA-Au nanoclusters [154], Au@Fe₃O₄ [155], Au@carbon dots [156]. Sự tăng cường nhuộm màu đã cải thiện cường độ màu cho các mảng màng DNA dựa trên sự phát triển trung gian hạt giống của nhân AuNP bởi HAuCl₄ và hydroxylamine [157]. Hydroxylammonium chloride được sử dụng làm chất khử trong quá trình nhuộm, có khả năng khử Au³⁺ thành Au⁰ và quá trình khử này có thể được xúc tác bởi bề mặt của AuNP [158]. Nồng độ HAuCl₄ và NH₂OH.HCl sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của hạt giống Au, do đó ảnh hưởng đến các phản ứng miễn dịch đo màu. Trong nghiên cứu này, nồng độ HAuCl₄ và

$\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ đã được khảo sát nhằm 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 (**Hình 3.14A**) và $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ 10 mM (**Hình 3.14B**). Với nồng độ HAuCl_4 cao hơn, màu của dung dịch chuyển từ hồng nhạt sang vàng (**Hình 3.14A**), trong khi chúng ổn định ở màu hồng đậm và cuối cùng chuyển sang xám ở nồng độ 150 mM đối với nồng độ $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ (**Hình 3.14B**).



Hình 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ HAuCl_4 (a) và $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ (b) lên khả năng tăng cường nhuộm màu được đo bằng độ hấp thụ tín hiệu ở 650 nm. Các nồng độ mol khác nhau của HAuCl_4 và $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ được trình bày lần lượt trong (a) và (b).

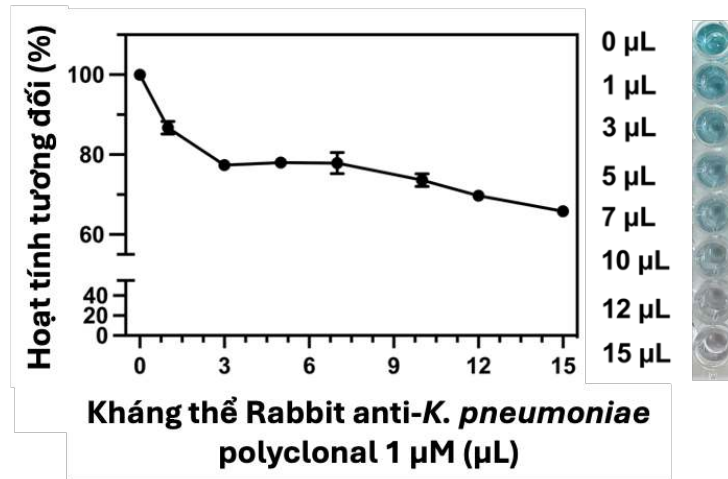
Nồng độ HAuCl_4 và $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ được thử nghiệm theo tỷ lệ tối ưu 1:5. **Hình 3.15** cho thấy AuNP có hoạt tính tăng cường nhuộm màu cao hơn đáng kể so với AuNP không nhuộm màu, cao hơn khoảng ba lần về mặt thống kê. Kết quả này cho thấy nanozyme, sau khi được tăng cường nhuộm màu, có hoạt tính tốt hơn, và việc sử dụng tăng cường nhuộm màu là khả thi.



Hình 3.15. 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. Các thí nghiệm được tiến hành trên mẫu đối chứng, AuNPs và nhuộm AuNPs. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn của ba phép đo lặp lại.

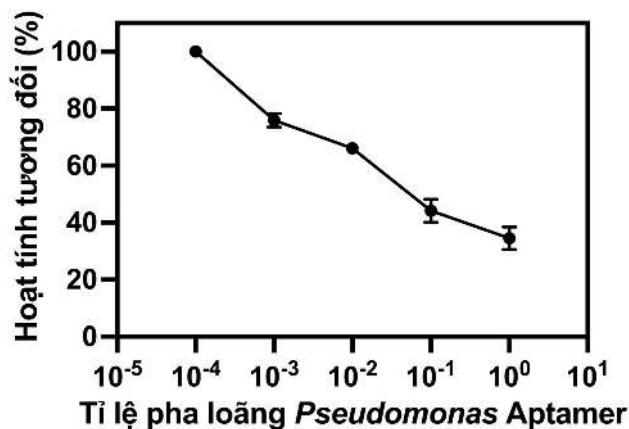
3.3.3. *Quá trình tối ưu hóa các điều kiện của nano-ELISA*

Các chiến lược khác nhau để liên kết kháng thể với AuNP bao gồm phủ trực tiếp, AuNP phủ PEG với kháng thể liên kết cộng hóa trị và AuNP phủ Streptavidin với kháng thể biotin hóa [159]. Hấp phụ thụ động là phương pháp truyền thống để gắn protein vào các hạt nano và vẫn được sử dụng rộng rãi bằng cách tận dụng lực liên phân tử giữa các phân tử và bề mặt. Độ phủ bề mặt kháng thể tốt hơn đối với hấp phụ trực tiếp so với liên kết cộng hóa trị giữa kháng thể-hạt nano, cho thấy có nhiều kháng thể được cố định thông qua hấp phụ không đặc hiệu hơn là liên kết cộng hóa trị [160]. Các điều kiện tối ưu cho cộng hợp thụ động Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal-AuNP thu được ở pH 9 trong điều kiện nhiệt độ phòng, khi không thu được kết tụ muối. Thí nghiệm này cũng đánh giá nồng độ kháng thể *K.pneumoniae* nào là tối ưu cho cộng hợp. Khi nồng độ Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal tăng lên, hoạt động của nanozyme bị ức chế, mạnh nhất là gần 35% ở 15 μL Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal 1 μM , cho thấy không có sự thay đổi về màu sắc sau 30 phút ủ (Hình 3.16). Tùy thuộc vào nồng độ Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal, hoạt động của nanozyme vẫn ổn định trong phạm vi từ 3 đến 7 μL 1 μM , sau đó giảm nhẹ sau 10 μL . Điều này có thể xác nhận rằng Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal đã được cộng hợp thành công trên bề mặt của hạt nano. Tuy nhiên, sự biến đổi bề mặt, chẳng hạn như sự hấp phụ protein, đã làm giảm nhẹ hoạt động peroxidase của nanozyme do các vị trí hoạt động trên bề mặt được bảo vệ khỏi tương tác với các chất nền [148]. Do đó, nồng độ Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal ở mức 5 μL 1 μM được lựa chọn do lượng Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal đủ trong cộng hợp và hoạt động của nanozyme được phát hiện ở bước sóng hấp phụ 650 nm.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của nồng độ kháng thể Rabbit anti-*K. pneumoniae* polyclonal lên hoạt tính nanozyme trong 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm. Các nồng độ mol khác nhau của kháng thể được trình bày trên hình.

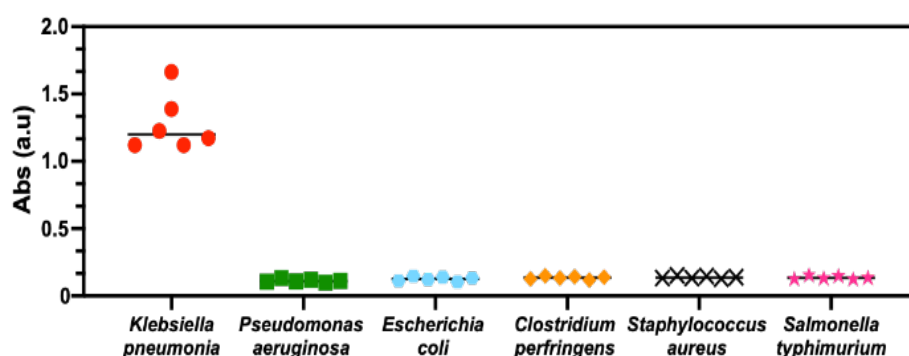
Tương tự, đối với thí nghiệm đánh giá nồng độ aptamer đặc hiệu cho *P. aeruginosa* tối ưu cho cộng hợp, nồng độ aptamer được pha loãng từ nồng độ gốc 2,8 mg/mL với các tỉ lệ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (**Hình 3.17**). Với nồng độ aptamer gốc, hoạt động của nanozyme bị ức chế, mạnh nhất là gần 70%. Ở nồng độ aptamer pha loãng 10^{-2} , hoạt động của nanozyme đạt trạng thái cân bằng với lượng aptamer đủ trong cộng hợp và nanozyme vẫn giữ được hoạt tính xúc tác khi đo ở bước sóng hấp phụ 650 nm.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của nồng độ aptamer đặc hiệu cho *P. aeruginosa* lên hoạt tính nanozyme trong 30 phút được đo bằng phương pháp hấp thụ tín hiệu ở bước sóng 650 nm. Tỉ lệ pha loãng nồng độ aptamer được trình bày trên hình.

3.3.4. Phân tích độ đặc hiệu của nano-ELISA với phương pháp nhuộm tăng cường phát hiện *K.pneumoniae*

Ngoài độ nhạy, độ đặc hiệu là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến tính khả thi của xét nghiệm miễn dịch cộng hợp AuNPs-Rabbit *anti-K.pneumoniae* polyclonal. Để nghiên cứu độ đặc hiệu của nano-ELISA trong việc phát hiện *K.pneumoniae*, các phản ứng miễn dịch với các vi khuẩn không phải mục tiêu khác được thực hiện, bao gồm *P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (Hình 3.18). Như có thể thấy rõ trong Hình 3.18, tín hiệu mẫu dương tính với *K.pneumoniae* (10^8 CFU/mL) được phát hiện trên 1 (a.u), cho thấy cộng hợp AuNPs-Rabbit *anti-K.pneumoniae* polyclonal gắn với vi khuẩn *K.pneumoniae* trong quá trình ủ khi Rabbit *anti-K.pneumoniae* polyclonal cộng hợp với AuNP đặc hiệu với *K.pneumoniae*. Ngược lại, các tín hiệu hấp thụ của các vi khuẩn khác đều thấp hơn giá trị ngưỡng. Những kết quả này chứng minh rằng quy trình nano-ELISA có khả năng chống lại sự tạp nhiễm và phát hiện đặc hiệu vi khuẩn *K.pneumoniae*.

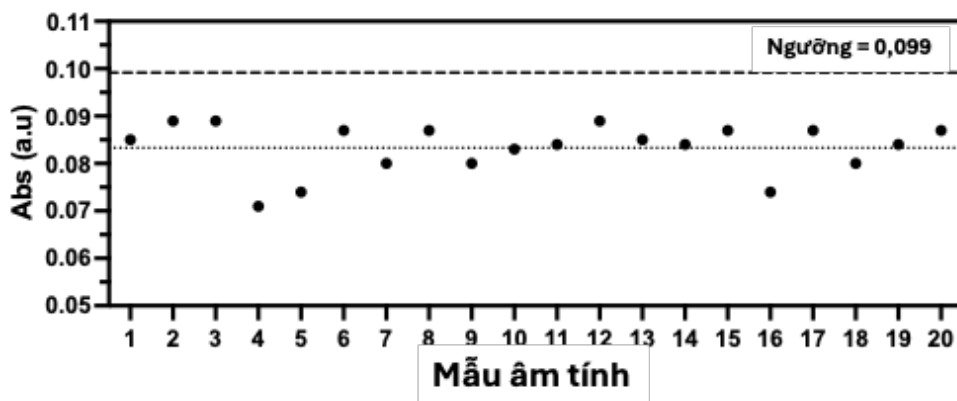


Hình 3.18. Phân tích độ đặc hiệu của nano-ELISA đối với các tác nhân gây bệnh phổ biến ở nồng độ 10^8 CFU/mL, bao gồm *P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* và *K.pneumoniae*.

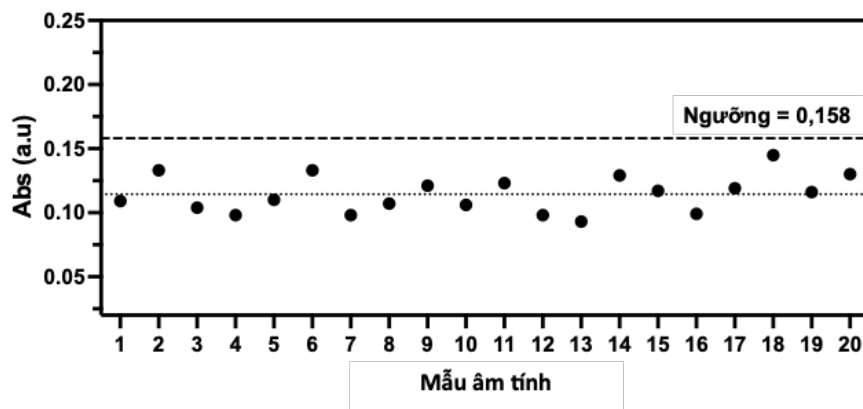
3.3.5. Xác định ngưỡng, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) của nano-ELISA có tăng cường nhuộm phát hiện *K.pneumoniae*

Giá trị OD 0,099 ở bước sóng 650 nm được tính là giá trị ngưỡng cho xét nghiệm nano-ELISA (Hình 3.19). Với sự tăng cường nhuộm, giá trị ngưỡng cao hơn ở mức 0,158 (Hình 3.20), 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. Độ nhạy và phạm vi đáp ứng tuyến tính của xét nghiệm Nano-ELISA với sự tăng cường nhuộm đã được

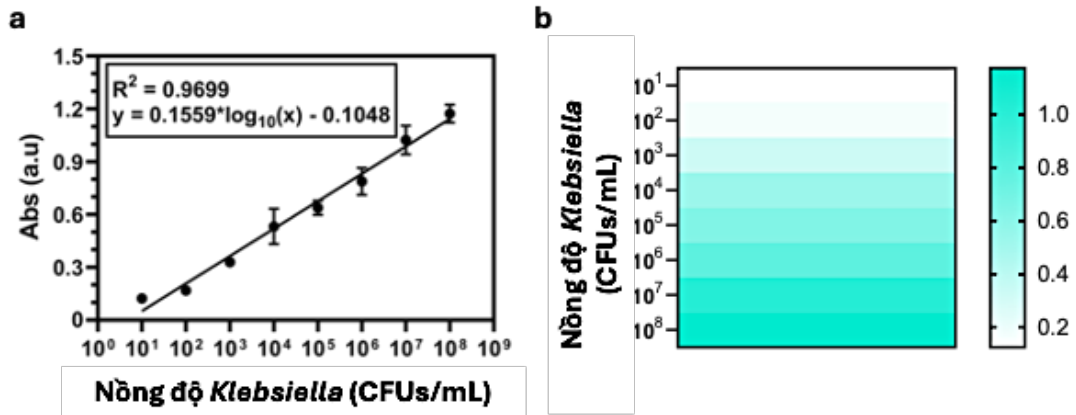
ngiên cứu bằng cách đo OD₆₅₀ để phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae* từ 10¹ đến 10⁸ CFU/mL (**Hình 3.21**). Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định là $y = 0,1559\log_{10}(x) - 0,1048$. Đường cong thể hiện mối tương quan dương cao giữa mật độ vi khuẩn *K.pneumoniae* (CFUs/mL) và tín hiệu OD₆₅₀ ($R^2 = 0,9699$). 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 3.22**). Bản đồ nhiệt gradient màu xanh lam-xanh lục cho thấy màu của các phản ứng miễn dịch thay đổi từ trắng sang xanh lam đậm tỷ lệ thuận với mật độ vi khuẩn *K.pneumoniae* (**Hình 3.21B**).



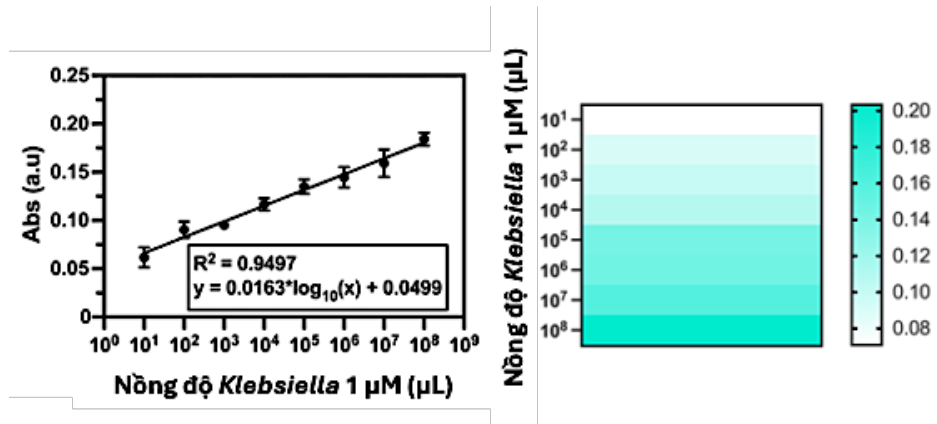
Hình 3.19. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp nano-ELISA: Giá trị ngưỡng được thiết lập bằng tổng của giá trị trung bình và ba lần độ lệch chuẩn.



Hình 3.20. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu. Giá trị ngưỡng được thiết lập bằng tổng của giá trị trung bình và ba lần độ lệch chuẩn.



Hình 3.21. Đường tuyến tính của vi khuẩn *K.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 *K.pneumoniae* từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (b) trong Nano-ELISA với khả năng tăng cường nhuộm màu.



Hình 3.22. Đường tuyến tính của vi khuẩn *K.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 *K.pneumoniae* từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (b) trong Nano-ELISA.

Vi khuẩn *K.pneumoniae* đã được phát hiện bằng nhiều loại kỹ thuật khác nhau, cho phép đạt được độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Một cảm biến sinh học điện hóa dựa trên MIP đã được phát triển để đo lường sự thay đổi tín hiệu điện ở các nồng độ *K. pneumoniae* khác nhau, từ 10 đến 10^5 CFU/mL, với độ nhạy đường tại cao [161]. Việc phát hiện *Enterococcus faecalis* (G+), *K.pneumoniae* (G-), *P.aeruginosa* (G-) và *Candida tropicalis* cũng được đánh giá trong cùng phạm vi nhận dạng, từ 10^1 đến 10^5 CFU/mL, sử dụng hạt nano từ tính phủ masto-paran để phát hiện điện hóa [162]. Hơn nữa, một nghiên cứu đã báo cáo về một thiết bị di động dựa trên chuyển đổi từ dòng chảy có khả năng phát hiện nhanh chóng và độ nhạy cao các tế bào vi khuẩn toàn bộ

trong các ma trận phức tạp, cung cấp kết quả định tính với độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 80,8% để phát hiện các tế bào viêm phổi do *Klebsiella* trong các mẫu xét nghiệm [163]. So với các phương pháp này, kết quả chỉ ra rằng kỹ thuật Nano-ELISA mới có thể phát hiện viêm phổi do *Klebsiella* với độ nhạy, độ tuyến tính và độ đặc hiệu cao hơn (**Bảng 3.8**).

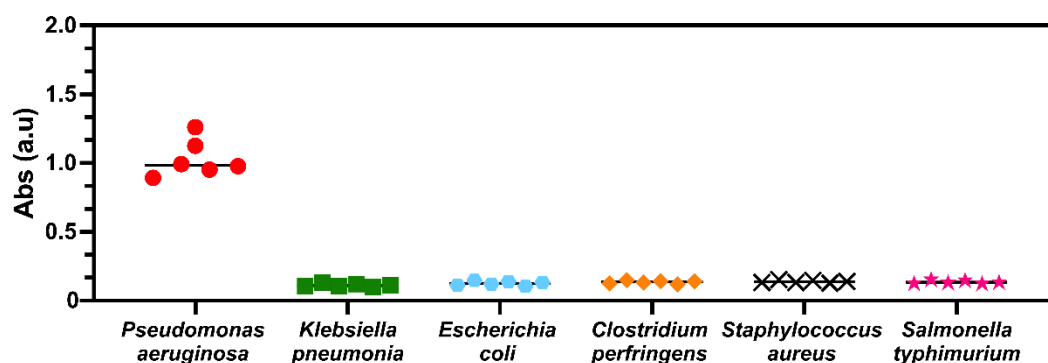
Bảng 3.8. So sánh phương pháp nghiên cứu với các phương pháp phát hiện viêm phổi do *Klebsiella* khác

Phương pháp	Độ nhạy	Đặc điểm	Tài liệu
PCR-ELISA	6.0 ng	DNA 16S được phát hiện bằng cộng hợp anti-DIG-peroxidase	[164]
ELISA gián tiếp	2.99×10^7 CFUs/ml	Độ đặc hiệu cao nhưng độ nhạy thấp	[165]
IC-LAMP	4 CFUs/mL	Beads-mAb 1E6-K. <i>pneumoniae</i> được sử dụng cho xét nghiệm LAMP	[166]
Xét nghiệm khuếch đại chéo đa dịch chuyển không nhân (MCDA)	480 CFUs/mL	Bổ sung enzyme AUDG để loại bỏ kết quả dương tính giả	[167]
Xét nghiệm miễn dịch từ	Định tính	Độ đặc hiệu thấp nhưng nhanh và thuận tiện	[163]
Polyme in phân tử (MIP)	10 CFUs/mL	Độ nhạy cao nhưng sai số lớn	[168]
Nano-ELISA	10^2 CFUs/mL	Độ nhạy và độ đặc hiệu cao	Nghiên cứu này

3.3.6. Phân tích độ đặc hiệu của nano-ELISA với phương pháp nhuộm tăng cường phát hiện *P.aeruginosa*

Kết quả cho thấy hệ thống phát hiện chỉ tạo tín hiệu hấp thụ (Abs) cao đối với *Pseudomonas aeruginosa*, với giá trị OD dao động khoảng 0,90–1,25, trong khi các vi khuẩn không đích gồm *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium* đều cho giá trị hấp thụ rất thấp (khoảng 0,08–0,15), gần tương đương với tín hiệu nền (**Hình 3.23**). Sự khác biệt rõ rệt giữa tín hiệu của *P. aeruginosa* và các vi khuẩn đối chứng chứng

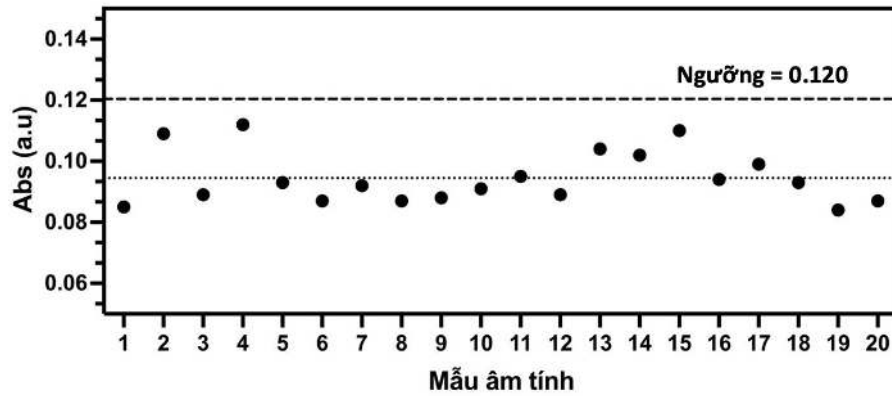
minh rằng aptamer được chọn lọc có tính đặc hiệu cao, nhận biết chọn lọc mục tiêu của *P. aeruginosa* và hầu như không xảy ra hiện tượng phản ứng chéo với các vi khuẩn khác. Điều này cho thấy quá trình sàng lọc aptamer bằng SELEX đã thành công trong việc loại bỏ các trình tự có khả năng liên kết không đặc hiệu.



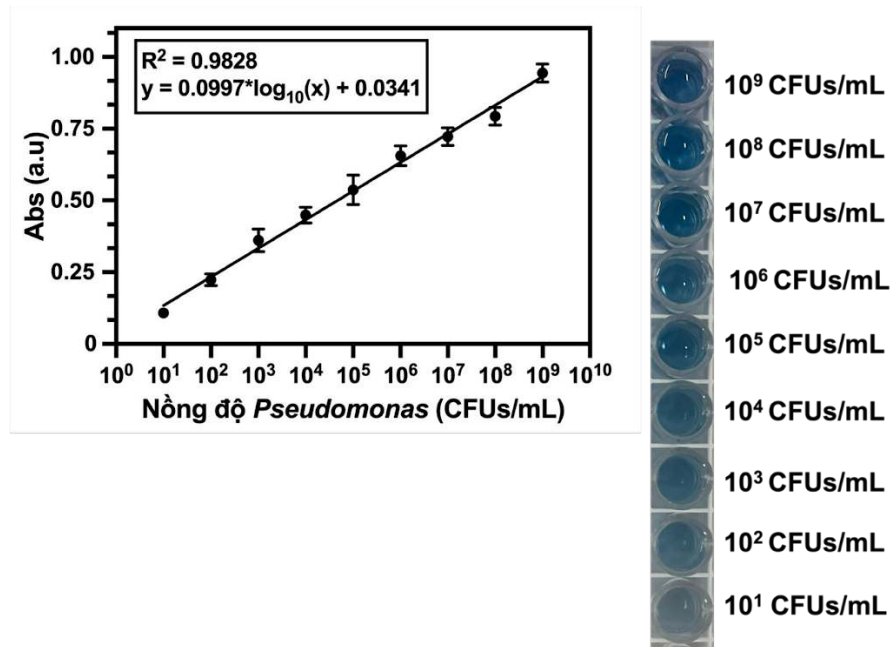
Hình 3.23. Phân tích độ đặc hiệu của Nano-ELISA đối với các tác nhân gây bệnh phổ biến ở nồng độ 10^9 CFU/mL, bao gồm *P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* và *K.pneumoniae*.

3.3.7. Xác định ngưỡng, giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) của nano-ELISA phát hiện *P.aeruginosa*

Giá trị ngưỡng được xác định ở 0.120, xác định rằng các mẫu có giá trị OD cao hơn 0,120 được coi là dương tính, và các mẫu có OD thấp hơn được coi là âm tính (**Hình 3.24**). 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 3.25**). 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 mật 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 3.24. Xác định giá trị ngưỡng (cutoff) cho phương pháp nano-ELISA phát hiện *P.aeruginosa*. Giá trị ngưỡng được thiết lập bằng tổng của giá trị trung bình và ba lần độ lệch chuẩn.



Hình 3.25. Đường tuyến tính của vi khuẩn *P.aeruginosa* với nồng độ pha loãng nối tiếp từ 10¹ đến 10⁹ 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.

Xét nghiệm miễn dịch đo màu, tiết kiệm chi phí và ít tốn thời gian đã được nghiên cứu thành công để phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa*. Các điều kiện thử nghiệm của từng thành phần trong phản ứng miễn dịch đã được tối ưu hóa, bao gồm cơ chất TMB, nồng độ H₂O₂, HAuCl₄ và NH₂OH.HCL để tăng cường nhuộm màu. Hoạt tính xúc tác của nanozyme thể hiện hiệu quả xúc tác ổn định, nhưng bị giảm gần 35% sau khi cộng hợp kháng thể *K.pneumoniae*, và cộng hợp aptamer đặc hiệu *P.aeruginosa*. Tuy nhiên, hiệu quả nhuộm màu tăng gấp ba lần so với AuNP thông thường, có khả năng phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae* ở mật độ thấp tới 10²

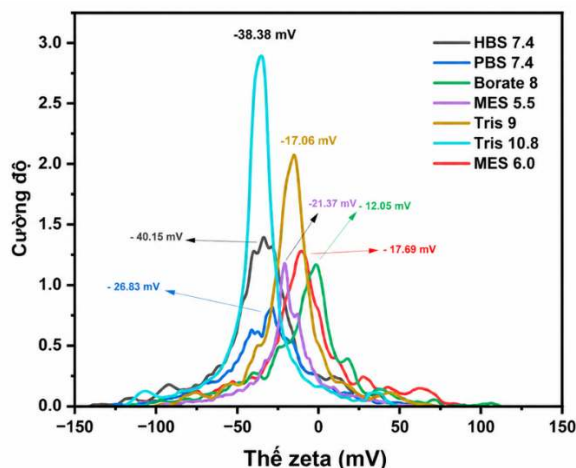
CFU/mL và đạt được đáp ứng tuyến tính cao, với giá trị R^2 là 0,9699. Đối với *P.aeruginosa*, Nano-ELISA có thể phát hiện vi khuẩn ở nồng độ 10^2 CFU/mL khi chưa có bước tăng cường nhuộm. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, số lượng chủng vi khuẩn dùng để đánh giá phản ứng chéo còn hạn chế, chưa bao quát đầy đủ các vi khuẩn Gram âm và Gram dương thường gặp trong nhiễm khuẩn bệnh viện. Đồng thời, Nano-ELISA sử dụng kháng thể đa dòng Rabbit anti-*K. pneumoniae* polyclonal nên có thể tồn tại nguy cơ nhận diện nhiều epitope tương đồng trên các vi khuẩn khác thuộc họ Enterobacteriaceae. Các nghiên cứu miễn dịch học cho thấy kháng thể đa dòng thường có độ nhạy cao nhưng độ đặc hiệu thấp hơn so với kháng thể đơn dòng do nhận diện nhiều vị trí kháng nguyên khác nhau. Đối với các nghiên cứu về cảm biến aptamer cho vi khuẩn, độ đặc hiệu cần được đánh giá trên phổ rộng các chủng lâm sàng để phản ánh đúng hiệu quả ứng dụng thực tế [144]. Độ đặc hiệu của hệ thống mới được đánh giá trong điều kiện *in vitro* với mẫu nuôi cấy tinh sạch, chưa khảo sát đầy đủ trên các bệnh phẩm lâm sàng phức tạp như máu, đờm hoặc nước tiểu. Các thành phần nền sinh học có thể ảnh hưởng đến cấu trúc aptamer, gây hấp phụ không đặc hiệu và làm thay đổi tín hiệu phát hiện [169]. Tóm lại, mặc dù kỹ thuật ELISA sử dụng aptamer, kháng thể và hạt nano vàng đã cho thấy tiềm năng cao trong phát hiện nhanh và nhạy vi khuẩn *P.aeruginosa* và *K.pneumoniae*, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế liên quan đến độ đặc hiệu, khả năng phản ứng chéo và phạm vi đánh giá trên mẫu lâm sàng thực tế. Do đó, để khẳng định tính ổn định, độ tin cậy, nghiên cứu cần tiếp tục mở rộng khảo sát chuyên sâu để đánh giá khả năng ứng dụng của hệ thống trong điều kiện chẩn đoán thực tế.

3.4. Phát triển que thử nhanh LFIA phát hiện *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa*

3.4.1. Kết quả tối ưu hóa dung dịch đệm chạy que thử

Để hiểu rõ hơn về ảnh hưởng của các dung dịch đệm đến hiệu quả tạo cộng hợp của hạt nano vàng với phân tử sinh học, đồng thời lựa chọn được loại đệm tối ưu nhằm cải thiện hiệu suất gắn kết, hai phương pháp: phổ UV-Vis và thế Zeta được lựa chọn để tiến hành phân tích. Các phương pháp này cho phép đánh giá khả năng phân tán, ổn định cũng như đặc tính bề mặt điện tích của hạt nano trong các môi trường đệm khác nhau. Nghiên cứu tiến hành khảo sát 5 loại đệm với các giá trị pH đặc trưng: HBS pH 7.4, PBS 7.4, Borate pH 8.0, MES pH 5.5, MES pH 6.0, Tris pH 9.0 và Tris pH 10.8. Kết quả phân bố thế zeta cho thấy tất cả các mẫu trong các hệ đệm

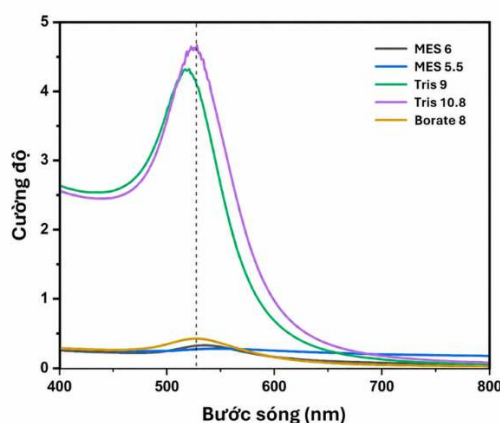
khảo sát đều mang điện tích bề mặt âm, với giá trị đỉnh dao động từ khoảng -12.05 mV đến -40.15 mV (**Hình 3.26**). Cụ thể, hạt nano vàng phân tán trong HBS 7.4 đạt khoảng -40.15 mV, Tris 10.8 đạt -38.38 mV, PBS 7.4 đạt -26.83 mV, MES 5.5 đạt -21.37 mV, Tris 9 đạt -17.06 mV, MES 6.0 đạt -17.69 mV, và Borate 8 đạt -12.05 mV. Sự khác biệt này cho thấy điện tích bề mặt của hệ phân tán phụ thuộc mạnh vào pH, thành phần ion và khả năng tương tác/che chắn điện tích của từng loại đệm [170].



Hình 3.26. Thế zeta của hạt nano vàng phân tán trong các dung dịch đệm khác nhau.

Theo nguyên tắc kinh nghiệm trong hóa keo, các hệ có $|\text{zeta potential}|$ khoảng trên 30 mV thường có xu hướng bền hơn về mặt tĩnh điện, giúp giữ chúng phân bố đồng đều và ngăn chặn kết tụ. Nếu hệ có $|\text{zeta potential}|$ từ 10 - 30 mV thì thường có tính ổn định trung bình, cần cân nhắc thêm các yếu tố khác (như độ nhớt hoặc lớp phủ bề mặt). Nếu hệ có $|\text{zeta potential}|$ dưới 10 mV thì thường không ổn định, hạt có xu hướng tạo cụm, phân bố không đều dẫn tới dung dịch có thể vẩn đục, lắng nhanh [171]. Trong đồ thị, HBS 7.4 và Tris 10.8 cho giá trị thế zeta âm lớn nhất, lần lượt khoảng -40.15 mV và -38.38 mV. Các giá trị này thường được xem là biểu hiện của hệ có lực đẩy điện mạnh và độ ổn định phân tán tương đối cao. Ngược lại, đệm Borate 8 có giá trị thế zeta khoảng -12.05 mV, gần trung hòa hơn so với các hệ đệm còn lại. Điều này cho thấy trong môi trường borate, điện tích âm hiệu dụng tại mặt trượt bị giảm đáng kể. Nguyên nhân có thể liên quan đến sự che chắn điện tích bởi ion trong dung dịch, sự thay đổi cấu trúc lớp điện kép, hoặc tương tác đặc hiệu giữa thành phần đệm và bề mặt mẫu. Khi lực ion tăng hoặc khi các ion hấp phụ gần bề mặt, chiều dày lớp điện kép bị nén lại, làm giảm độ lớn của thế zeta [172]. Các hệ MES 5.5, MES 6.0 và Tris 9 có giá trị thế zeta nằm ở vùng trung gian, khoảng -17 đến -21 mV. Kết quả này cho thấy điện tích âm bề mặt vẫn tồn tại nhưng lực đẩy tĩnh điện yếu hơn so với HBS 7.4 và Tris 10.8. Đáng chú ý, khi so sánh MES 5.5 với MES 6.0, giá trị chuyển từ -21.37 mV sang -17.69 mV, cho thấy chỉ một thay đổi nhỏ về pH cũng có

thể làm thay đổi trạng thái ion hóa của các nhóm chức trên bề mặt hoặc thay đổi cân bằng tương tác ion trong môi trường [173]. Ngoài giá trị đỉnh, hình dạng các đường phân bố cũng cần được chú ý. Đệm Tris 9, Tris 10.8, MES 5.5, MES 6, Borate 8 cho thấy quần thể hạt hoặc cấu trúc trong dung dịch có phân bố điện tích tương đối tập trung. Trong khi đó, các đường có nền rộng hoặc nhiều vai phụ có thể phản ánh sự không đồng nhất của hệ, bao gồm sự tồn tại của nhiều quần thể kích thước/điện tích khác nhau, mức độ tương tác khác nhau giữa mẫu và đệm, hoặc hiện tượng kết tụ nhẹ [174]. Do đó, nghiên cứu đã lựa chọn 5 dung dịch đệm này để tiếp tục tiến hành phân tích phổ UV-Vis.

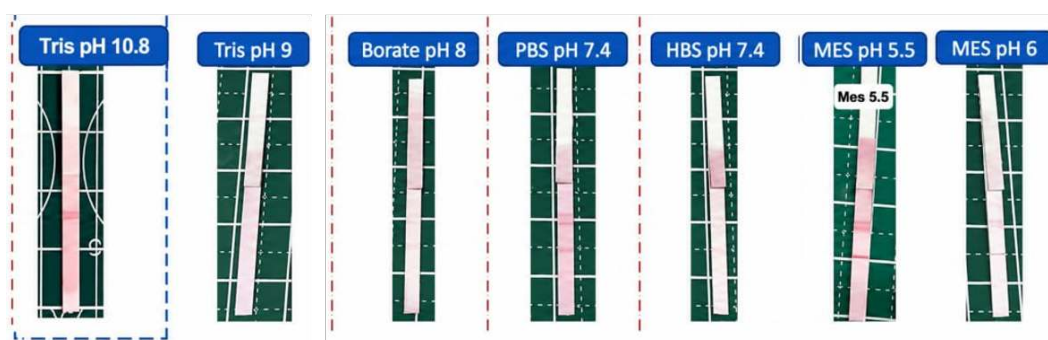


Hình 3.27. Phổ hấp thụ UV-Vis của hạt nano vàng phân tán trong các dung dịch đệm khác nhau.

Đồ thị phổ hấp thụ UV-Vis cho thấy cường độ phát xạ phụ thuộc rất rõ vào loại đệm và pH của môi trường. Hai hệ Tris 9 và Tris 10.8 có tín hiệu mạnh nhất, với đỉnh phát xạ nằm xấp xỉ vùng 520–530 nm. Trong đó, Tris 10.8 cho cường độ cao nhất, khoảng gần 4.6–4.7, tiếp theo là Tris 9 với cường độ khoảng 4.2–4.3. Ngược lại, các hệ MES 6, MES 5.5 và Borate 8 chỉ cho tín hiệu thấp, dao động chủ yếu dưới khoảng 0.5 (**Hình 3.27**). Sự khác biệt về cường độ giữa các hệ đệm cho thấy môi trường dung dịch ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính quang học của AuNPs. Đệm Tris 10.8 cho cường độ cao nhất, tiếp theo là Tris 9, chứng tỏ trong môi trường kiềm Tris, hạt nano vàng có thể được ổn định tốt hơn hoặc có mật độ hạt phân tán hiệu quả cao hơn trong vùng hấp thụ plasmon. Ngược lại, các hệ MES 5.5, MES 6 và Borate 8 có tín hiệu thấp hơn nhiều, cho thấy khả năng hấp thụ plasmon yếu hơn, có thể do nồng độ hạt phân tán thấp hơn, tương tác bề mặt khác nhau, hoặc sự thay đổi trạng thái ổn định keo của AuNPs trong từng hệ đệm.

Kết quả tối ưu hóa cho thấy dung dịch đệm Tris pH 10,8 tạo tín hiệu màu rõ và ổn định hơn so với các hệ đệm khác (**Hình 3.28**). Điều này có thể được giải thích dựa trên ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của hạt nano vàng (AuNPs), hiệu quả liên kết

sinh học của aptamer/kháng thể với hạt nano vàng. Sự thay đổi pH có thể làm thay đổi điện thế zeta và tương tác tĩnh điện giữa các hạt nano, từ đó ảnh hưởng đến độ ổn định keo và hiện tượng kết tụ của AuNPs [175]. Trong môi trường kiềm nhẹ, lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt tăng lên, giúp hạn chế kết tụ không đặc hiệu và duy trì khả năng di chuyển ổn định của phức hợp trên màng nitrocellulose. Điều này góp phần làm tín hiệu trên vạch thử rõ và đồng đều hơn. Ngoài ra, đệm Tris được chứng minh có khả năng duy trì ổn định tốt cho các hệ AuNPs sinh học nhờ hạn chế tương tác ion mạnh với bề mặt hạt nano [176]. Các ion phosphate trong PBS có thể hấp phụ cạnh tranh lên bề mặt AuNPs và ảnh hưởng đến hiệu quả cộng hợp sinh học, dẫn đến gây ra tín hiệu dương tính giả ngay khi không có vi khuẩn mục tiêu (**Hình 3.28**), trong khi đệm Tris giúp duy trì sự ổn định và phân tán tốt hơn của hạt nano vàng trong các hệ cảm biến sinh học. Bên cạnh đó, pH kiềm còn có thể làm tăng khả năng ion hóa của các nhóm chức trên aptamer hoặc kháng thể, từ đó cải thiện cấu hình không gian và khả năng nhận diện kháng nguyên đích [177].



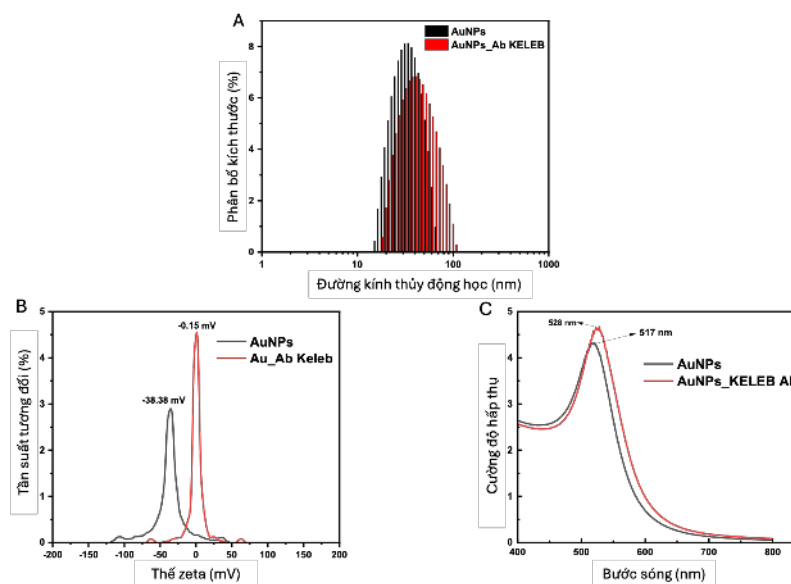
Hình 3.28. Ảnh hưởng của các hệ đệm và pH khác nhau đến tín hiệu của que thử LFIA

3.4.2. Que thử nhanh phát hiện *K.pneumoniae*

3.4.2.1. Cộng hợp cộng hóa trị hạt nano vàng và kháng thể Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal

Có nhiều kỹ thuật khác nhau để cộng hợp hạt nano vàng (AuNPs) với kháng thể, bao gồm các tương tác vật lý (tương tác ion, tương tác kỵ nước, liên kết phối trí) và các tương tác hóa học (hấp phụ hóa học, phản ứng EDC/NHS, và sử dụng phân tử trung gian) [178]. Trong nghiên cứu này, phương pháp liên kết cộng hóa trị được sử dụng nhằm gắn các nhóm chức lên bề mặt AuNPs thông qua phản ứng EDC/NHS, qua đó khắc phục các hạn chế thường gặp của các phương pháp liên kết không cộng hóa trị, chẳng hạn như yêu cầu nồng độ kháng thể cao và sự định hướng ngẫu nhiên của kháng thể trên bề mặt hạt nano vàng [179]. Phổ hấp thụ UV-Vis (**Hình 3.29C**) cho thấy đỉnh plasmon đặc trưng của AuNPs đơn phân tán nằm khoảng 517 nm, trong

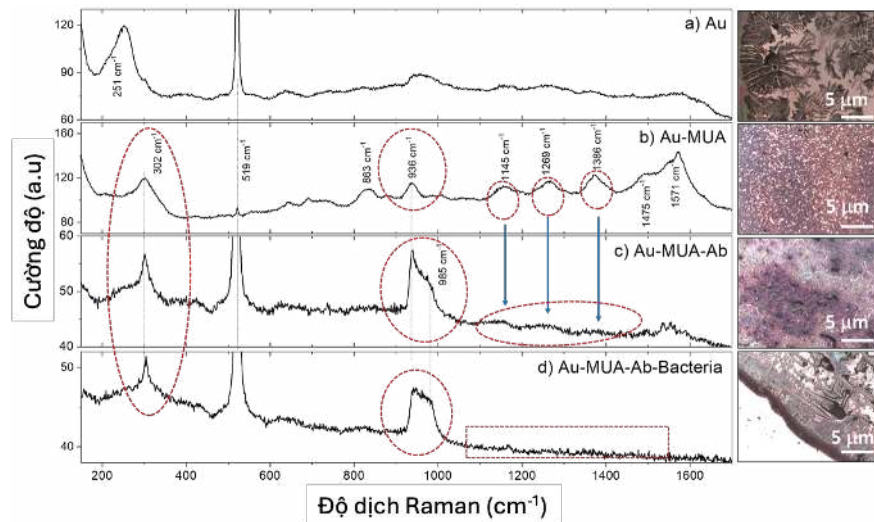
khi đỉnh của phức AuNPs–*Rabbit anti-K.pneumoniae polyclonal* bị dịch bathochromic đến 528 nm. Sự dịch chuyển này chứng tỏ quá trình chức năng hóa AuNPs bằng phối tử MUA đã liên kết hiệu quả với phân tử kháng thể *Rabbit anti-K.pneumoniae polyclonal*. Bên cạnh đó, giá trị thế zeta (zeta potential) và kích thước động học (DLS) được đo để đánh giá điện tích bề mặt và kích thước thủy động học của AuNPs trước và sau khi cộng hợp với kháng thể *Rabbit anti-K.pneumoniae polyclonal*. Kết quả cho thấy thế zeta của AuNPs giảm từ $-38,38$ mV xuống $-0,15$ mV (**Hình 3.29B**), 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 3.29A**), xác nhận sự bao phủ của các phân tử kháng thể quanh bề mặt AuNPs.



Hình 3.29. (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 *Rabbit anti-K.pneumoniae polyclonal*.

Phổ Raman tăng cường bề mặt (SERS) được sử dụng rộng rãi để phát hiện các biến đổi trên bề mặt vật liệu kim loại nhờ độ nhạy cao, tính đặc hiệu bề mặt, và khả năng cung cấp thông tin cấu trúc chi tiết. SERS có tính đặc hiệu bề mặt cao vì hiệu ứng tăng cường chỉ xảy ra tại hoặc gần bề mặt kim loại, khiến kỹ thuật này trở thành một công cụ tuyệt vời để nghiên cứu các loài liên kết trên bề mặt, các quá trình biến đổi bề mặt, cũng như các phản ứng xảy ra tại giao diện kim loại. **Hình 3.30** trình bày phổ SERS của các hạt nano vàng (AuNPs) sau từng giai đoạn biến đổi, bao gồm biến

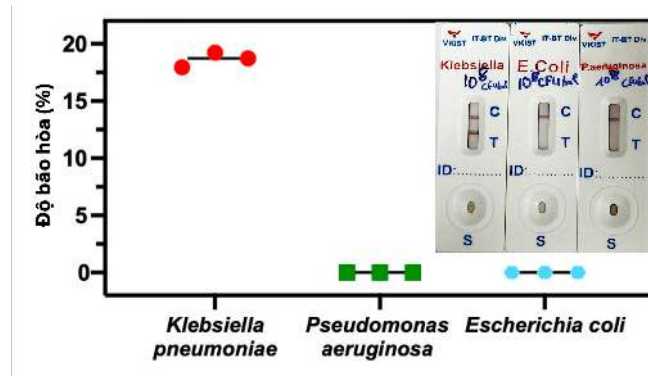
đôi với MUA (b), gắn kháng thể (c), và tương tác với vi khuẩn (d). Trong suốt quá trình biến đổi, các hạt được phân tán trong dung dịch đệm TRIS-HCl pH 10,8 có chứa 0,1% BSA, 0,5% Tween 20 và 0,5% sucrose. Dao động kéo giãn Au-S là chỉ thị đặc trưng cho sự tương tác giữa nhóm thiol (-SH) và bề mặt vàng (Au). Khi một phân tử chứa nhóm thiol liên kết với hạt nano vàng hoặc bề mặt vàng, liên kết S-H bị đứt và một liên kết Au-S mới được hình thành. Sự hình thành liên kết mới này có thể được phát hiện trong phổ Raman thông qua đỉnh đặc trưng ở vùng tần số thấp, với vạch ở 302 cm^{-1} được quy cho dao động Au-S trong mẫu Au-MUA. Trong phổ Raman, các đỉnh đặc trưng cho nhóm carboxyl (-COOH) thường xuất hiện trong các vùng tương ứng với dao động kéo giãn C-O và dao động uốn O-H. Dao động C-O thường nằm trong khoảng $1200\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$, trong khi dao động uốn O-H của nhóm hydroxyl trong nhóm carboxyl thường xuất hiện ở khoảng $1390\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$. Ở đường phổ (b) trong **Hình 3.30**, các dải tín hiệu được quan sát tại 1145 cm^{-1} , 1269 cm^{-1} và 1386 cm^{-1} , lần lượt được quy cho dao động kéo giãn C-O và dao động uốn O-H. Ngoài ra, các đỉnh đặc trưng cho dao động $\nu(\text{C-COOH})$ của nhóm acid carboxylic cũng được phát hiện tại 936 cm^{-1} và 863 cm^{-1} , cho thấy phân tử MUA tương tác với bề mặt AuNPs thông qua nhóm thiol. Tuy nhiên, khi hạt Au-MUA tương tác với kháng thể, và sau đó với vi khuẩn *K.pneumoniae*, các dải tín hiệu này biến mất khỏi phổ SERS (đường c và d trong **Hình 3.30**), ngoại trừ đỉnh tại 936 cm^{-1} , vốn có xu hướng mở rộng và dịch chuyển đến 985 cm^{-1} . Sự thay đổi này cho thấy kháng thể đã liên kết với nhóm -COOH trên bề mặt hạt vàng, làm thay đổi tần số dao động của liên kết này. Khi có sự hiện diện của vi khuẩn đích, các vi khuẩn liên kết với kháng thể trên hạt Au-MUA, dẫn đến thay đổi bổ sung trong tần số dao động của liên kết Au-S.



Hình 3.30. Phổ SERS của các hạt nano vàng (AuNPs) sau từng bước biến đổi bề mặt, bao gồm: (b) biến đổi với MUA, (c) gắn kháng thể kháng Rabbit anti-*K.pneumoniae* polyclonal, và (d) tương tác với vi khuẩn *K.pneumoniae*.

3.4.2.2. Phân tích tính đặc hiệu của que thử LFIA kết hợp với hệ thống bão hòa màu

Thí nghiệm đánh giá tính đặc hiệu được thực hiện nhằm kiểm tra khả năng nhận diện của que thử LFIA đối với *K.pneumoniae*, *Escherichia coli* và *P.aeruginosa* ở nồng độ 10^8 CFU/mL, nhằm xác định khả năng xuất hiện tín hiệu dương tính giả của hệ thống. Kết quả 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 3.34**). Bên cạnh đó, mẫu dương tính với *K.pneumoniae* cho tín hiệu bão hòa màu vượt quá 15%, trong khi các mẫu chứa *E. coli* và *P.aeruginosa* chỉ ghi nhận tín hiệu gần như bằng 0% (**Hình 3.31**). Những kết quả này 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 *K.pneumoniae*.



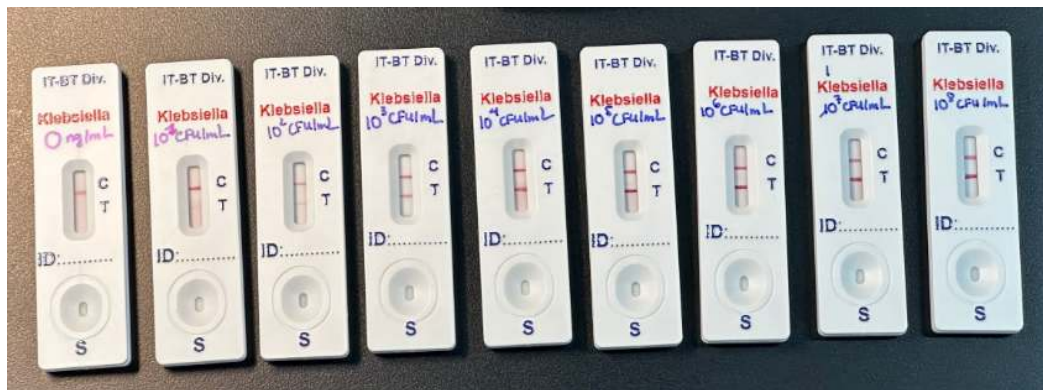
Hình 3.31. Phân tích độ đặc hiệu của que thử phát hiện *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, và *P.aeruginosa* ở nồng độ 10^8 CFUs/mL

3.4.2.3. Xác định giới hạn phát hiện (LoD), giới hạn định lượng (LoQ) và phân tích độ bão hòa màu của que thử LFIA kết hợp với hệ thống phân tích độ bão hòa màu

Các que thử LFIA được chế tạo theo cơ chế “sandwich”, trong đó mẫu di chuyển dọc theo que thử thông qua dòng mao dẫn qua nhiều màng chồng lên nhau đã được phủ sẵn với chất đánh dấu mục tiêu. Tấm đệm mẫu, đệm cộng hợp và màng nitrocellulose được xử lý trước khi lắp ráp nhằm cân bằng màng, giảm thiểu sự liên kết không đặc hiệu và tạo điều kiện cho sự di chuyển dễ dàng của chất phân tích qua màng [180].

Các que thử LFIA được chế tạo và đánh giá khả năng phát hiện *K.pneumoniae* trong dải nồng độ từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL (Hình 3.32). Vạch phát hiện của *K.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 3.32. (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. Sau đó, các hình ảnh này được phân tích cường độ màu tại vạch thử (T-line) bằng phần mềm Color Grab.

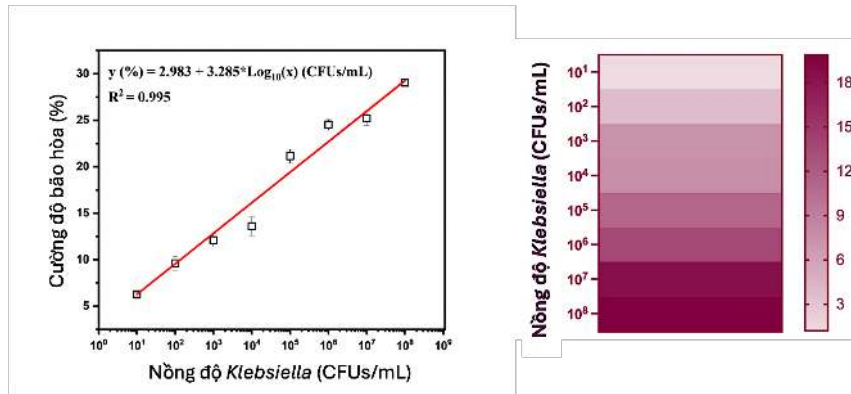
Các giá trị R, G và B trong mô hình RGB được sử dụng để xác định cường độ và độ bão hòa màu tại vạch thử (T-line) của LFIA (**Bảng 3.9**). Phương trình hồi quy tuyến tính được xác định là $y = 2,983 + 3,285 \log_{10}(x)$. Đường hồi quy thể hiện mối tương quan cao giữa nồng độ *K.pneumoniae* và tín hiệu bão hòa màu với $R^2 = 0,995$ (**Hình 3.33**). Giới hạn phát hiện (LoD) và giới hạn định lượng (LoQ) lần lượt được tính là 1,61 và 4,83 CFU/mL.

Bảng 3.9. Các giá trị R, G, và B trong mô hình RGB xác định cường độ và độ bão hòa của màu sắc tại vạch thử (T-line) của que thử LFIA.

Nồng độ <i>K.pneumoniae</i> (CFU/mL)	3 thử nghiệm lặp lại	R	G	B	Chuyển đổi từ RGB sang độ bão hòa	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
10^1	Thử nghiệm 1	174	170	163	6.36	6.257	0.215
	Thử nghiệm 2	183	179	172	6.01		
	Thử nghiệm 3	172	168	161	6.40		
10^2	Thử nghiệm 1	155	135	132	11.31	9.603	0.759
	Thử nghiệm 2	148	129	125	9.70		
	Thử nghiệm 3	145	129	125	8.80		
10^3	Thử nghiệm 1	149	126	122	11.30	12.083	0.700
	Thử nghiệm 2	148	123	118	12.30		
	Thử nghiệm 3	148	122	117	12.65		
10^4	Thử nghiệm 1	155	130	124	13.42	13.600	0.992

	Thử nghiệm 2	152	128	122	12.71		
	Thử nghiệm 3	159	134	126	14.67		
10^5	Thử nghiệm 1	132	90	87	20.55	21.143	0.738
	Thử nghiệm 2	133	90	87	20.91		
	Thử nghiệm 3	136	89	87	21.97		
10^6	Thử nghiệm 1	98	61	60	24.05	24.523	0.573
	Thử nghiệm 2	97	59	57	24.36		
	Thử nghiệm 3	97	62	58	25.16		
10^7	Thử nghiệm 1	102	62	60	25.93	25.210	0.775
	Thử nghiệm 2	102	55	55	24.39		
	Thử nghiệm 3	117	70	69	25.31		
10^8	Thử nghiệm 1	128	70	81	29.29	29.058	0.258
	Thử nghiệm 2	132	73	85	28.78		
	Thử nghiệm 3	122	67	72	29.10		

Mẫu trắng	R	G	B	Chuyển đổi từ RGB sang độ bão hòa
1	186	192	185	5.26
2	183	188	182	4.29
3	182	187	181	4.23
4	213	209	211	4.55
5	182	187	192	3.55
6	183	188	182	4.29
7	185	190	183	5.11
8	182	187	181	4.23
9	185	191	184	5.19
10	213	209	211	4.55
Giá trị trung bình				4.525
Độ lệch chuẩn				0.533



Hình 3.33. (A) Đường cong hiệu chuẩn và **(B)** bản đồ nhiệt dạng thang màu hồng của *K.pneumoniae* với dãy nồng độ pha loãng tuần tự từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL.

Que thử LFIA kết hợp với hệ thống phân tích độ bão hòa màu có thể phát hiện nồng độ thấp đến 10^1 CFU/mL, thấp hơn 10 lần so với giới hạn phát hiện bằng mắt thường. Hình ảnh gốc của từng nồng độ trong khoảng từ 10^1 đến 10^8 CFU/mL được thể hiện trong **Hình 3.34**, và các phép đo lặp lại cho thấy hệ thống phân tích độ bão hòa màu có độ tin cậy cao và thích hợp cho phân tích định lượng. Bản đồ nhiệt thang màu hồng cho thấy màu của các vạch thử chuyển dần từ trắng sang hồng đậm, tỷ lệ thuận với nồng độ *K.pneumoniae* (**Hình 3.33B**).



Hình 3.34. Hình ảnh gốc của các que thử LFIA với dãy pha loãng của vi khuẩn *K.pneumoniae* từ 10^8 đến 10^1 CFU/mL, được thực hiện với ba lần lặp lại và mười mẫu trắng.

Nhiều kỹ thuật tiên tiến đã được phát triển nhằm phát hiện vi khuẩn *K.pneumoniae* với độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội. Một cảm biến aptamer tại điểm chăm sóc (point-of-care aptasensor) đã được phát triển dựa trên hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt cục bộ (LSPR) của các hạt vàng nano (AuNPs), cho phép phát hiện *K.pneumoniae* với giới hạn phát hiện (LoD) thấp đến $3,4 \times 10^3$ CFU/mL [181]. Ngoài ra, một que thử sắc ký miễn dịch dòng chảy ngang (LFIA) cũng đã được chế tạo dựa trên sự cộng hợp không cộng hóa trị giữa các hạt vàng nano, tuy nhiên giới hạn phát hiện của phương pháp này chỉ đạt đến 10^5 CFU/mL đối với *K.pneumoniae* [182]. Hơn nữa, một nền tảng polyme in phân tử (MIP) cũng đã được phát triển để phát hiện *K.pneumoniae* với giới hạn phát hiện thấp, đạt 1,352 CFU/mL [183]. So sánh với các phương pháp khác được trình bày trong **Bảng 3.10** [184–186], kết quả của nghiên cứu cho thấy rằng que thử sắc ký miễn dịch dòng chảy ngang (LFIA) định lượng dựa trên điện thoại thông minh, kết hợp với hệ thống bảo hòa màu, có khả năng phát hiện *K.pneumoniae* với độ nhạy cao, tính tuyến tính tốt, khả năng ứng dụng thực địa và chi phí chẩn đoán thấp.

Bảng 3.10. So sánh phương pháp nghiên cứu trong công trình này với các phương pháp phát hiện *K.pneumoniae* khác

Phương pháp	Độ nhạy	Đặc điểm	Tham khảo
LFIA thụ động	10^5 CFUs/mL	Độ nhạy thấp nhưng độ đặc hiệu cao, có thể bị ảnh hưởng bởi sự gắn kết không đủ giữa kháng thể và kháng nguyên	[180], [181]
MCDA-LFB	$2,4 \times 10^3$ CFUs/mL	Độ nhạy chưa cao	[182]
LFIA cộng hóa trị	10^1 CFUs/mL	Độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhờ vào sự gắn kết chính xác và ổn định hơn của các kháng thể với hạt mang	Nghiên cứu này

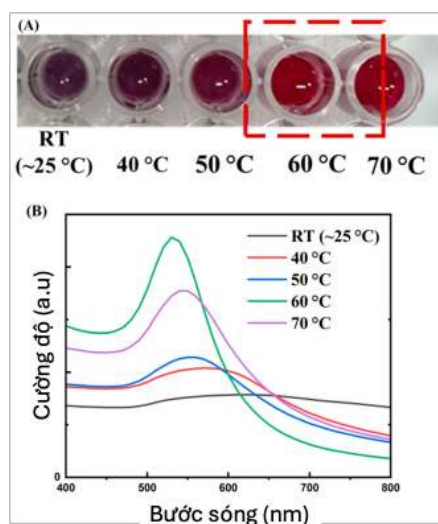
Nghiên cứu này đã báo cáo về việc phát triển các que thử miễn dịch dòng chảy bên (LFIA) dựa trên cộng hợp cộng hóa trị với hạt vàng keo, nhằm phát hiện nhanh và định lượng vi khuẩn *K.pneumoniae* thông qua hệ thống bảo hòa màu. Phương pháp này đạt được phản ứng tuyến tính cao với giá trị $R^2 = 0,995$ và có khả năng phát hiện *K.pneumoniae* ở nồng độ thấp đến 10^1 CFU/mL, thể hiện độ nhạy vượt trội trong các ứng dụng thực tiễn. Kết quả nghiên cứu chứng minh rằng việc sử dụng ứng dụng đo màu trên thiết bị di động là một phương pháp nhanh chóng và hiệu quả để đo độ bão

hòa màu của vạch trên que thử LFIA, từ đó xác định chính xác nồng độ *K.pneumoniae* theo cách định lượng.

3.4.3. Que thử test nhanh LFIA phát hiện *P.aeruginosa*

3.4.3.1. Cộng hợp và tối ưu hóa phức hợp Aptamer T1-AuNP

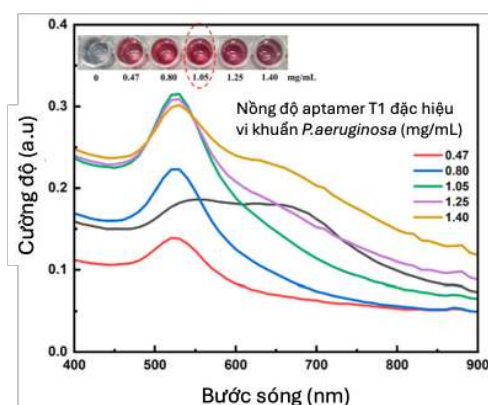
Để tối ưu hóa quá trình cộng hợp giữa aptamer T1 và hạt nano vàng (AuNPs), hai thông số quan trọng được khảo sát đồng thời là nhiệt độ và nồng độ aptamer, vì cả hai yếu tố này đều ảnh hưởng đến hiệu suất cộng hợp. Trước tiên, ảnh hưởng của nhiệt độ được đánh giá tại một nồng độ aptamer cố định nhằm xác định nhiệt độ tối ưu cho quá trình cộng hợp. Sau đó, với nhiệt độ tối ưu này, ảnh hưởng của nồng độ aptamer đến hiệu suất cộng hợp được tiếp tục khảo sát. Cách tiếp cận tuần tự này cho phép đánh giá có hệ thống từng thông số và xác định điều kiện mang lại hiệu suất gắn kết cao nhất.



Hình 3.35. (A) Màu sắc của các dung dịch AuNP được ủ với aptamer T1 (0,80 mg/mL) ở các mức nhiệt độ khác nhau (RT ~25°C, 40°C, 50°C, 60°C và 70°C) trong 1 giờ, sau khi thêm 10% NaCl. Mẫu ở RT chuyển sang màu tím đậm, các mẫu ở 40°C và 50°C có màu tím nhạt hơn, trong khi các mẫu ở 60°C và 70°C vẫn giữ màu đỏ tươi đặc trưng của AuNPs. **(B)** Phổ UV–Vis của các dung dịch trong (A) cho thấy mẫu ủ ở 60°C có cường độ hấp thụ cao nhất, cho thấy độ ổn định keo của phức hợp AuNP–aptamer đạt tối ưu ở điều kiện này.

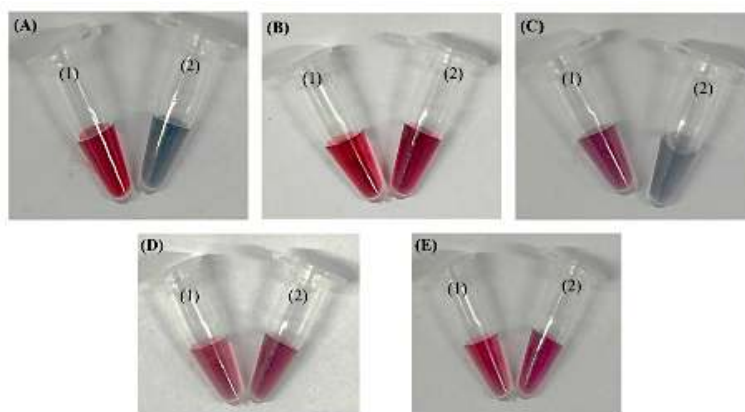
Quá trình cộng hợp aptamer lên bề mặt hạt nano vàng (AuNPs) thông qua tương tác tĩnh điện thường được thực hiện ở nhiệt độ cao nhằm tăng hiệu quả gắn kết và độ ổn định của lớp phủ aptamer T1 trên bề mặt hạt. Ở nhiệt độ phòng, aptamer – vốn là các chuỗi oligonucleotide – có xu hướng hình thành các cấu trúc bậc hai như

kẹp tóc (hairpin) hoặc thân–vòng (stem–loop), làm che khuất các nhóm phosphate mang điện âm và làm giảm khả năng tương tác với bề mặt vàng. Việc tăng nhiệt độ lên khoảng 50–70°C giúp phá vỡ tạm thời các cấu trúc bậc hai này, khiến chuỗi aptamer duỗi ra và lộ ra các vùng mang điện âm, từ đó tăng cường khả năng hấp phụ tĩnh điện lên bề mặt AuNPs. Ngoài ra, nhiệt độ cao còn làm tăng năng lượng động học của các phân tử, giúp aptamer khuếch tán nhanh hơn trong dung dịch và tiếp cận bề mặt vàng hiệu quả hơn [187]. Quá trình này cũng giúp ngăn chặn hiện tượng kết tụ AuNPs, vốn có thể xảy ra khi aptamer gắn không đều hoặc tạo cầu nối giữa các hạt. Đáng chú ý, khi sử dụng aptamer có nhóm thiol để hình thành liên kết cộng hóa trị Au–S, việc gia nhiệt trong khoảng 50–70°C vẫn an toàn, không làm phá vỡ liên kết Au–S mà vẫn tận dụng được lợi ích của việc duỗi aptamer trong quá trình cộng hợp. Để tối ưu hóa nhiệt độ cộng hợp, aptamer T1 (nồng độ 0,80 mg/mL) được ủ với AuNPs trong dung dịch đệm borate (pH 9) trong 1 giờ ở các mức nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (RT), 40, 50, 60 và 70°C. Sau đó, thêm 10% NaCl vào mỗi mẫu và quan sát màu dung dịch. Kết quả cho thấy, ở RT dung dịch chuyển sang màu tím đậm, ở 40°C và 50°C màu tím nhạt dần, trong khi ở 60 °C và 70 °C dung dịch vẫn giữ màu đỏ rượu đặc trưng của AuNPs (**Hình 3.35A**). Phổ UV–Vis sau khi thêm 10% NaCl (**Hình 3.35B**) cho thấy mẫu ủ ở 60°C có cường độ hấp thụ cao nhất. Do đó, độ ổn định keo của phức hợp AuNPs–aptamer được đánh giá thông qua quan sát màu và phép đo quang phổ UV–Vis. Dựa trên các kết quả này, 60°C được lựa chọn là nhiệt độ tối ưu cho quá trình cộng hợp aptamer lên bề mặt AuNPs.



Hình 3.36. Phổ hấp thụ UV–Vis của các phức hợp AuNP–aptamer T1 được chuẩn bị với các nồng độ aptamer đặc hiệu đối với *P. aeruginosa* khác nhau sau khi thêm NaCl, thể hiện sự dịch chuyển đỉnh plasmon liên quan đến hiện tượng kết tụ và độ ổn định của hạt nano

Sau khi xác định được nhiệt độ cộng hợp tối ưu, thí nghiệm tiếp theo được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ aptamer đến hiệu suất cộng hợp trong điều kiện nhiệt độ cố định. Khả năng cộng hợp và ổn định của phức hợp AuNP–aptamer được khảo sát bằng cách ủ các hạt AuNP với các thể tích khác nhau (0, 5, 10, 15, 20 và 25 μL) của dung dịch gốc aptamer T1 (2,8 mg/mL), tương ứng với các nồng độ cuối cùng là 0, 0,47, 0,80, 1,05, 1,25 và 1,40 mg/mL. Các hỗn hợp được ủ trong đệm borate (pH 9) ở 60°C trong 1 giờ. Sau đó, 10 μL dung dịch NaCl 10% được thêm vào mỗi mẫu để đánh giá hiện tượng kết tụ do muối – một chỉ số gián tiếp phản ánh mức độ phủ bề mặt và độ ổn định của hạt nano. Quan sát bằng mắt cho thấy chỉ ở các nồng độ aptamer 0,47; 1,25; và 1,40 mg/mL, dung dịch chuyển từ đỏ ruby đặc trưng của AuNPs ổn định sang tím nhạt sau khi thêm muối (**Hình 3.36**). Sự thay đổi màu này cho thấy hiện tượng kết tụ hạt nano, xảy ra khi lớp phủ aptamer trên bề mặt AuNPs không đủ tối ưu để tạo ra hiệu ứng ổn định tĩnh điện và cản trở không gian, khiến các ion muối làm suy giảm điện tích bề mặt và thúc đẩy sự kết tụ. Phân tích phổ UV–Vis củng cố các quan sát trên, với giảm cường độ hấp thụ hoặc dịch đỉnh plasmon từ khoảng 520 nm ở các nồng độ aptamer thấp – dấu hiệu của hiện tượng kết tụ hạt. Ngược lại, ở nồng độ aptamer cao hơn ($\geq 1,05$ mg/mL), dung dịch vẫn giữ được màu đỏ ruby đặc trưng, và phổ UV–Vis thể hiện đỉnh cộng hưởng plasmon sắc nét trong khoảng 520–525 nm, tương ứng với trạng thái AuNPs ổn định, không kết tụ. Đáng chú ý, việc tăng thêm nồng độ aptamer vượt quá 1,05 mg/mL không mang lại cải thiện đáng kể về độ ổn định, cho thấy bề mặt AuNPs đã đạt trạng thái bão hòa. Do đó, 1,05 mg/mL được lựa chọn làm nồng độ aptamer tối ưu cho các quy trình cộng hợp tiếp theo. Việc sử dụng đệm borate pH 9 và ủ ở 60°C được cho là đã thúc đẩy quá trình hấp phụ vật lý hiệu quả của aptamer lên bề mặt AuNPs, tạo nên lớp phủ đồng đều và ổn định hơn. Sự tối ưu này không chỉ đảm bảo hiệu quả gắn kết aptamer cao, mà còn tăng cường độ nhạy và độ bền lâu dài của hệ cảm biến sinh học, đặc biệt trong ứng dụng chẩn đoán vi sinh vật như phát hiện *P. aeruginosa* (**Hình 3.36**).



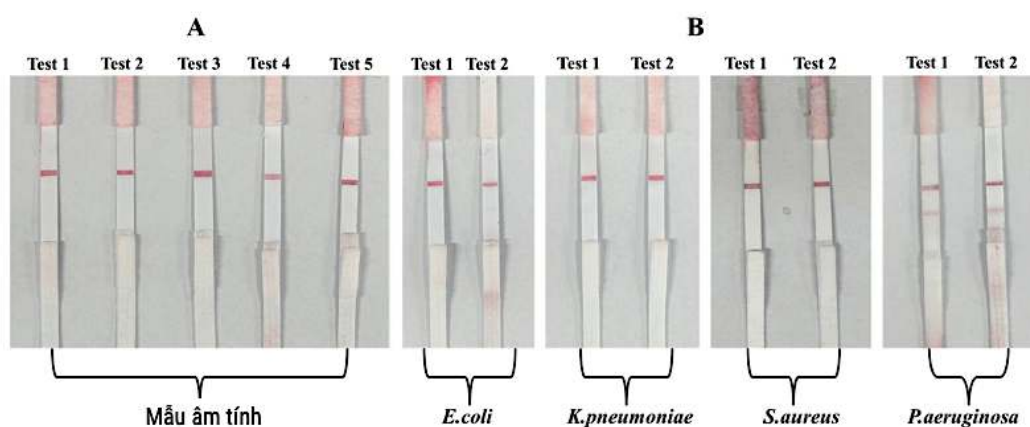
Hình 3.37. Màu sắc của các dung dịch: (A) AuNPs; (B) phức hợp AuNP–aptamer; (C) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với *P. aeruginosa*; (D, E) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với các vi khuẩn không đích (*K. pneumoniae* và *S. aureus*, tương ứng), trước (1) và sau (2) khi thêm NaCl.

Phép thử kết tụ đơn giản trong ống nghiệm được phát triển nhằm xác minh khả năng liên kết đặc hiệu của phức hợp AuNP–aptamer với vi khuẩn đích. Cơ chế này tương tự với các phép thử màu sắc dựa trên aptamer–AuNP đã được mô tả trước đây, trong đó sự tách rời của aptamer do tương tác với tác nhân đích làm mất ổn định hạt nano, dẫn đến kết tụ do muối và thay đổi màu sắc [188]. **Hình 3.37** minh họa màu sắc của các dung dịch: (A) AuNPs; (B) phức hợp AuNP–aptamer; (C) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với *P. aeruginosa*; (D, E) phức hợp AuNP–aptamer được ủ với các vi khuẩn không đích (*K. pneumoniae* và *S. aureus*, tương ứng), trước (1) và sau (2) khi thêm NaCl. Sau khi thêm muối, các AuNP bị kết tụ rõ rệt, thể hiện qua sự chuyển màu từ đỏ rượu sang xanh–tím. Ngược lại, các AuNP được chức năng hóa bằng aptamer vẫn giữ được màu đỏ đặc trưng, chứng tỏ aptamer đã ổn định hóa hạt nano và ngăn chặn kết tụ do muối. Tuy nhiên, khi có mặt vi khuẩn đích (*P. aeruginosa*), các aptamer liên kết đặc hiệu với tế bào vi khuẩn và bị “kéo tách” khỏi bề mặt AuNPs, khiến các hạt nano mất lớp bảo vệ và trở nên dễ kết tụ khi thêm muối, dẫn đến sự thay đổi màu sắc tương tự AuNPs. Trái lại, không quan sát thấy sự thay đổi màu ở các mẫu chứa vi khuẩn không đích, khẳng định tính đặc hiệu cao của hệ cảm biến.

3.4.3.2. Đánh giá độ đặc hiệu của que thử bằng mẫu trắng và vi khuẩn không mục tiêu

Để đánh giá độ đặc hiệu của que thử LFIA lai tạo đã phát triển, các thí nghiệm ban đầu được thực hiện với các mẫu đệm trắng và huyền phù chứa các chủng vi khuẩn

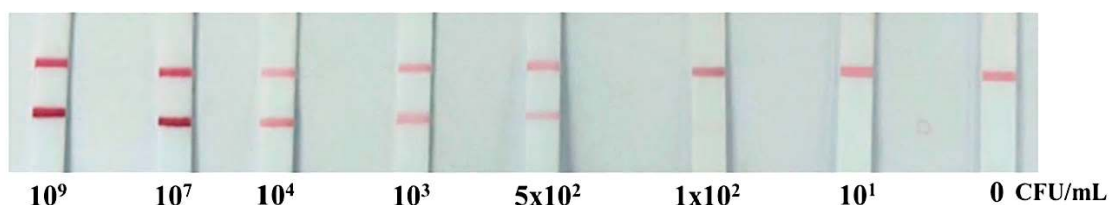
không mục tiêu. Mẫu trắng được sử dụng nhằm xác nhận sự vắng mặt của tín hiệu không đặc hiệu tại vùng kiểm tra (test zone), đồng thời đảm bảo rằng các phức hợp aptamer–AuNP vẫn ổn định và không tạo ra kết quả dương tính giả. Các chủng vi khuẩn không mục tiêu, bao gồm *E. coli*, *K. pneumoniae*, và *S. aureus*, được khảo nghiệm ở nồng độ 10^3 CFU/mL để đánh giá khả năng phản ứng chéo tiềm tàng. Hệ thống LFIA có độ đặc hiệu cao được kỳ vọng chỉ tạo ra vạch kiểm tra rõ ràng khi có mặt tác nhân gây bệnh mục tiêu *P. aeruginosa*, trong khi các chủng không mục tiêu sẽ cho tín hiệu rất yếu hoặc không xuất hiện. Kết quả được trình bày trong **Hình 3.38**. 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. Kết quả này khẳng định rằng các phức hợp aptamer T1–AuNP không gắn kết không đặc hiệu với tế bào vi khuẩn không mục tiêu, qua đó loại trừ khả năng dương tính giả. Ngược lại, các mẫu có bổ sung *P. aeruginosa* ở nồng độ đại diện 10^3 CFU/mL xuất hiện hai vạch rõ ràng—vạch T và vạch C—chứng minh khả năng nhận diện đặc hiệu của aptamer T1 đối với vi khuẩn mục tiêu. Sự hiện diện ổn định của vạch C trong tất cả các phép thử xác nhận dòng chảy và hoạt động bình thường của que thử LFIA, trong khi sự xuất hiện chọn lọc của vạch T chỉ khi có *P. aeruginosa* chứng minh độ đặc hiệu cao của hệ thống phân tích.



Hình 3.38. Đánh giá độ đặc hiệu sử dụng mẫu trắng, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, và *P. aeruginosa*. (A) Hình ảnh các que thử sau khi kiểm tra với mẫu trắng (không chứa vi khuẩn); (B) Hình ảnh các que thử sau khi kiểm tra với các mẫu *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, và *P. aeruginosa*, mỗi mẫu có cùng nồng độ 10^3 CFU/mL.

3.4.3.3. Đánh giá độ nhạy với các mẫu *P. aeruginosa* được pha chuẩn

Để xác định độ nhạy phân tích của que thử LFIA đã phát triển, một loạt mẫu *P. aeruginosa* có nồng độ xác định được chuẩn bị bằng cách pha thêm huyền phù vi khuẩn vào dung dịch đệm phản ứng. Cách tiếp cận này cho phép kiểm soát chính xác nồng độ tác nhân đích, từ đó đánh giá chính xác giới hạn phát hiện (LOD) thấp nhất của phép thử. Các que thử thu được được quan sát bằng mắt thường và phân tích bán định lượng nhằm xác định giới hạn phát hiện cũng như khả năng đáp ứng của hệ thống trong phạm vi mật độ vi khuẩn khác nhau. Hiệu suất của que thử LFIA sử dụng aptamer T1 được đánh giá với các mẫu *P. aeruginosa* có nồng độ pha chuẩn từ 10^1 đến 10^9 CFU/mL. Ở mỗi nồng độ, phức hợp AuNP–aptamer T1 được trộn với mẫu và ủ ở 60°C trong 30 phút để thúc đẩy quá trình nhận biết đích và hình thành phức AuNP–aptamer–vi khuẩn. Hỗn hợp sau đó được nhỏ lên vùng mẫu của que thử, và kết quả được ghi nhận sau 10–15 phút. 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 mật độ vi khuẩn (**Hình 3.39**). Ở nồng độ cao (10^9 – 10^7 CFU/mL), vạch T hiện rõ và sắc nét, cho thấy sự bắt giữ hiệu quả phức hợp AuNP–aptamer–vi khuẩn tại vùng thử. Khi mật độ vi khuẩn giảm xuống 10^4 – 5×10^2 CFU/mL, vạch T mờ dần nhưng vẫn có thể quan sát được bằng mắt thường. Ở nồng độ 10^2 CFU/mL, vạch T rất mờ và khó nhận thấy, trong khi ở 10^1 CFU/mL, vạch gần như biến mất hoàn toàn.



Hình 3.39. 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** (<https://imagej.nih.gov/ij/>, truy cập ngày 13 tháng 8 năm 2025). ImageJ là một công cụ phân tích hình ảnh mã nguồn mở, miễn phí, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu khoa học nhờ khả năng đo cường độ tín hiệu dựa trên mật độ điểm ảnh (pixel density) với độ chính xác và khả năng tái lập cao. Việc sử dụng phần mềm này giúp tiêu chuẩn hóa quy trình phân tích, giảm thiểu sai lệch do đánh giá bằng mắt thường, đồng thời cho phép xuất dữ liệu số hóa phục vụ xử lý thống kê, qua đó nâng cao độ tin cậy của kết quả phân tích bán định lượng LFIA. Hình ảnh được thu nhận ở định

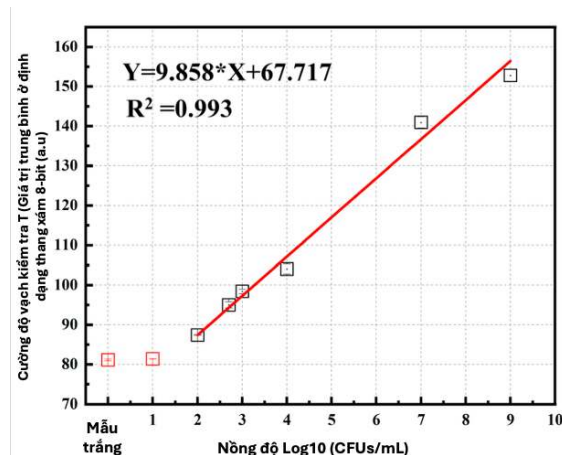
dạng thang xám 8-bit, trong đó giá trị cường độ điểm ảnh dao động từ 0 (đen) đến 255 (trắng). Độ sâu bit này được lựa chọn nhằm đảm bảo độ tương phản và chi tiết đủ để trích xuất đặc trưng chính xác, đồng thời giảm dung lượng tệp và tải xử lý. Chế độ thang xám cũng loại bỏ ảnh hưởng của thông tin màu, tập trung hoàn toàn vào sự thay đổi độ sáng. Để tăng cường khả năng phân biệt giữa vạch thử và nền, chế độ Invert LUT được áp dụng trước khi đo, khiến các vạch thử dương tính mạnh hiển thị dưới dạng các vùng sáng. Sự điều chỉnh này giúp định lượng chính xác hơn giá trị cường độ điểm ảnh của cả vạch thử (T-line) và vạch kiểm soát (C-line). Dữ liệu cường độ thu được sau đó được sử dụng để xây dựng đường cong hiệu chuẩn, trong đó cường độ tín hiệu đo được tỷ lệ thuận với nồng độ *P. aeruginosa* được phát hiện trên que thử LFIA. **Bảng 3.11** và **Bảng 3.12** trình bày giá trị cường độ màu của vạch T đối với mẫu trắng và các mẫu chứa *P. aeruginosa* ở các nồng độ khác nhau. Từ các giá trị này, một đường cong hiệu chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa cường độ vạch T và nồng độ *P. aeruginosa* đã được xây dựng (**Hình 3.40**). 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 mật 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 ($R^2 = 0.993$). Giá trị R^2 cao cho thấy phép thử cung cấp phản hồi định lượng ổn định và có độ tái lập cao trong toàn bộ dải nồng độ được khảo sát. Độ dốc của đường hồi quy (9.858) phản ánh độ nhạy của phép thử, thể hiện sự gia tăng rõ rệt của cường độ tín hiệu khi mật độ vi khuẩn tăng lên. Dựa trên đường chuẩn này, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định lần lượt là $2,34 \times 10^2$ CFU/mL và $7,02 \times 10^2$ CFU/mL, với độ lệch chuẩn của tín hiệu mẫu trắng là 1,109. Các kết quả này cho thấy dải LFIA được phát triển có độ nhạy phân tích cao, với giới hạn phát hiện thấp tới $2,34 \times 10^2$ CFU/mL, thấp hơn hoặc tương đương với nhiều phép thử LFIA dựa trên kháng thể đã được báo cáo cho *P. aeruginosa*. Ngoài ra, độ lệch chuẩn thấp của tín hiệu mẫu trắng (1,109) chứng tỏ hiệu suất nền ổn định, đảm bảo khả năng phát hiện đáng tin cậy ở mật độ vi khuẩn thấp. Độ nhạy này đủ để phát hiện sớm *P. aeruginosa* trong các mẫu lâm sàng và môi trường mà không cần các bước khuếch đại tín hiệu bổ sung.

Bảng 3.11. Giá trị cường độ màu của vạch thử (T-line) đối với các mẫu trắng

Mẫu trắng	Cường độ vạch kiểm tra T (Giá trị trung bình ở định dạng thang xám 8-bit (a.u))	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
1	81.029	80.771	1.109
2	79.317		
3	79.656		
4	79.456		
5	81.370		
6	81.357		
7	82.507		
8	81.368		
9	81.024		
10	81.924		

Bảng 3.12. Giá trị cường độ màu của vạch thử (T-line) đối với các nồng độ khác nhau của mẫu *P.aeruginosa*

Nồng độ <i>P.aeruginosa</i> (CFU/mL)	Giá trị Log10	Cường độ vạch kiểm tra T (Giá trị trung bình ở định dạng thang xám 8-bit (a.u))		Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
10 ⁹	9.00	Test 1	154.499	152.766	1.609
		Test 2	151.320		
		Test 3	152.479		
10 ⁷	7.00	Test 1	139.736	140.934	1.428
		Test 2	140.552		
		Test 3	142.515		
10 ⁴	4.00	Test 1	103.569	104.022	1.239
		Test 2	105.424		
		Test 3	103.074		
10 ³	3.00	Test 1	98.232	98.383	0.604
		Test 2	99.048		
		Test 3	97.887		
5 × 10 ²	2.70	Test 1	95.887	94.974	0.792
		Test 2	94.569		
		Test 3	94.468		
10 ²	2.00	Test 1	87.526	87.405	0.106
		Test 2	87.331		
		Test 3	87.357		
10 ¹	1.00	Test 1	81.368	81.370	0.014
		Test 2	81.357		
		Test 3	81.370		
Mẫu trắng	0.00	Test 1	81.357	81.102	0.227
		Test 2	81.024		
		Test 3	81.940		

**Hình 3.40.** Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ giữa cường độ vạch thử (T-line) và nồng độ của *P. aeruginosa* trong mẫu.

3.4.3.4. Ưu điểm, hạn chế và triển vọng của que thử LFIA dựa trên aptamer

Trong nghiên cứu này, một phương pháp SELEX toàn tế bào được cải tiến đã được áp dụng bằng cách sử dụng tế bào *P. aeruginosa* bất hoạt, với các bước chọn lọc loại trừ (counter-selection) chống lại *E. coli* và *K. pneumoniae* ở vòng thứ năm và thứ bảy nhằm nâng cao tính đặc hiệu. Sau 10 vòng chọn lọc, sáu aptamer có ái lực liên kết cao đã được xác định, trong đó aptamer T1 thể hiện cấu trúc ổn định và hiệu suất liên kết vượt trội. Aptamer T1 được tích hợp vào hệ thống LFIA, thay thế cho kháng thể phát hiện truyền thống. Cơ chế phát hiện dựa trên phức hợp AuNP–aptamer liên kết với vi khuẩn mục tiêu, sau đó được bắt giữ tại vạch thử (T) bởi các kháng thể được cố định, tạo ra tín hiệu màu đỏ đặc trưng. Kết quả thực nghiệm cho thấy aptamer T1 có khả năng nhận biết đặc hiệu *P. aeruginosa* với giới hạn phát hiện (LoD) đạt $2,34 \times 10^2$ CFU/mL trong vòng 15 phút. Hệ thống LFIA được phát triển mang lại phản ứng nhanh, chi phí thấp, dễ sử dụng, và không yêu cầu thiết bị chuyên dụng, do đó phù hợp cho ứng dụng tại điểm chăm sóc sức khỏe (POCT), đặc biệt trong các khu vực có nguồn lực hạn chế.

Bảng 3.13. So sánh các phương pháp LFIA đã được báo cáo cho phát hiện *Pseudomonas* với hệ thống LFIA lai trong nghiên cứu này

Phương pháp	Tín hiệu	LoD	Thời gian xét nghiệm	Loại mẫu	Ưu điểm	Tài liệu
RPA-LFS LasB gene	Đo màu AuNP	10^3 CFU/mL	1 giờ	DNA từ vi khuẩn	Độ nhạy và độ đặc hiệu cao, không cần máy PCR	[189]
MCDA-LFB (MCDA+AuNP-LFA)	Đo màu AuNP	10 fg DNA	40 phút	DNA từ vi khuẩn	Nhanh, quan sát được, không cần thiết bị	[190]
Mag@QDs-WGA LFA	Huỳnh quang LFA	10^1 – 10^2 CFU/mL	35 phút	Mẫu thức ăn/ môi trường	Rất nhạy, có khả năng phát hiện đa mục tiêu, phổ rộng	[191]
LAMP-LFB	Đo màu AuNP	10^2 CFU/mL	1 giờ	Mẫu DNA sinh học	Đơn giản, phù hợp cho lâm sàng	
AuNP–aptamer + antibody LFIA lai	Đo màu AuNP	10^2 CFU/mL	15 phút	Tế bào vi khuẩn	Nhạy, nhanh, phù hợp phát hiện tại chỗ	Nghiên cứu này

Để đạt hiệu suất và khả năng ứng dụng của hệ thống phát hiện tại chỗ (POC) được đề xuất vào bối cảnh so sánh rõ ràng hơn, nghiên cứu đã so sánh nó với các nền tảng xét nghiệm miễn dịch dòng chảy bên (LFIA) đã được báo cáo trước đây dùng cho việc phát hiện *Pseudomonas*. **Bảng 3.13** tóm tắt các đặc điểm phân tích chính, loại mục tiêu, giới hạn phát hiện, thời gian xét nghiệm, và nguyên lý phát hiện của các hệ thống đại diện. Sự so sánh này cho thấy những ưu điểm nổi bật của phương pháp trong nghiên cứu phát triển về tính đơn giản, tốc độ phản ứng nhanh, và khả năng ứng dụng thực địa, đặc biệt là trong các xét nghiệm tại chỗ (on-site) mà không cần cơ sở hạ tầng phòng thí nghiệm chuyên biệt.

Một hạn chế đáng chú ý của hệ thống LFIA sử dụng aptamer thay vì kháng thể là cần thời gian ủ tối thiểu 30 phút để đảm bảo sự gắn kết hiệu quả giữa aptamer và vi khuẩn đích. Do đó, các phức hợp aptamer-hạt vàng (AuNP) không thể được lưu trữ sẵn trên miếng đệm cộng hợp (conjugate pad) như trong LFIA thông thường, mà phải được bảo quản ở dạng dung dịch và ủ riêng với mẫu trước khi chạy que thử. Điều này làm giảm tính tiện lợi cho người dùng, đặc biệt trong các ứng dụng chẩn đoán nhanh tại hiện trường. Để khắc phục hạn chế này và tăng khả năng ứng dụng thực tiễn, một số hướng cải tiến có thể được triển khai trong các nghiên cứu tiếp theo: Tối ưu cấu trúc aptamer thông qua các phương pháp SELEX tiên tiến nhằm rút ngắn thời gian gắn kết với vi khuẩn, từ đó giảm thời gian ủ cần thiết; thiết kế lại cấu trúc vật lý của que thử, chẳng hạn tích hợp buồng cộng hợp nạp sẵn aptamer-AuNP dạng đông khô, cùng với các thành phần như muối Mg^{2+}/Na^{+} , BSA, trehalose và PEG/dextran đóng vai trò tác nhân đông tụ, giúp tái hydrat hóa nhanh và tăng tốc độ gắn kết, đồng thời đơn giản hóa quy trình thao tác mà vẫn duy trì độ nhạy và độ đặc hiệu cao; áp dụng định dạng “gấp giấy” (origami LF) để tạo buồng ủ khép kín cho phức hợp aptamer-AuNP với mẫu; dòng chảy chỉ bắt đầu sau thời gian ủ định sẵn khi người dùng gấp que thử — giúp tự động hóa và rút gọn thao tác. Những cải tiến này không chỉ giúp nâng cao hiệu suất của hệ thống LFIA dựa trên aptamer mà còn mở rộng khả năng ứng dụng của chúng trong chẩn đoán nhanh tại điểm chăm sóc (POC diagnostics).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chiến lược kết hợp giữa kỹ thuật sắc ký miễn dịch dòng chảy bên (LFIA) và nano-ELISA có tiềm năng lớn trong phát triển các nền tảng chẩn đoán nhanh đối với *K.pneumoniae* và *P.aeruginosa* [192]. LFIA có ưu điểm về thời gian phân tích ngắn, thao tác đơn giản và khả năng triển khai tại chỗ, tuy nhiên thường bị hạn chế về độ nhạy và khả năng định lượng. Trong nghiên cứu này, việc tích hợp hệ thống phân tích hình ảnh trên điện thoại thông minh đã giúp cải thiện đáng kể khả năng định lượng tín hiệu màu của que thử LFIA, từ đó nâng cao độ nhạy

phát hiện xuống mức 10^1 CFU/mL đối với *K. pneumoniae* và $2,34 \times 10^2$ CFU/mL đối với *P. aeruginosa*. Các nghiên cứu gần đây cho thấy việc sử dụng smartphone kết hợp xử lý ảnh số có thể cải thiện đáng kể độ nhạy của LFIA và mở rộng khả năng ứng dụng trong chẩn đoán nhanh vi sinh vật gây bệnh [192]. Ngoài ra, việc sử dụng aptamer như đầu thu sinh học trong LFIA và nano-ELISA cũng mang lại nhiều ưu điểm so với kháng thể truyền thống, bao gồm khả năng tổng hợp hóa học ổn định, chi phí sản xuất thấp, dễ biến đổi chức năng và khả năng chịu nhiệt tốt. Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn tồn tại một số hạn chế. Thứ nhất, việc đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chủ yếu được thực hiện trên mẫu nuôi cấy tinh sạch trong điều kiện *in vitro*, chưa phản ánh đầy đủ ảnh hưởng của nền mẫu lâm sàng phức tạp như máu, đờm hoặc nước tiểu. Thứ hai, số lượng chủng vi khuẩn sử dụng để đánh giá phản ứng chéo còn hạn chế, chưa bao quát đầy đủ các vi khuẩn Gram âm thường gặp trong nhiễm khuẩn bệnh viện. Các cảm biến sử dụng kháng nguyên đa dòng và aptamer chọn lọc whole-cell SELEX vẫn tồn tại nguy cơ phản ứng chéo với các vi khuẩn có cấu trúc kháng nguyên tương đồng. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần mở rộng đánh giá trên số lượng lớn mẫu lâm sàng và nhiều chủng vi khuẩn phân lập thực tế nhằm xác định toàn diện độ nhạy, độ đặc hiệu và khả năng phản ứng chéo.

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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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> (Q1, IF 4.3)
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 (Q2, IF 2.1)
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 Hybrid Lateral Flow Assay." *Molecules* 30, no. 17 (2025): 3499. <https://doi.org/10.3390/molecules30173499> (Q1, IF 4.6)
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) (Q1, IF 4.6)

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chakravarthy M, Myatra S N, Rosenthal V D, Udwardia F E, Gokul B N, Divatia J V, Poojary A, Sukanya R, Kelkar R and Koppikar G 2015 The impact of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) multicenter, multidimensional hand hygiene approach in two cities of India *J. Infect. Public Health* **8** 177–86
- [2] Zirpe K G, Gurav S K, Dhawad P A, Tiwari A M, Deshmukh A M, Suryawanshi P B, Kapse U S, Wankhede P P, Bhoyar A P and Malhotra R V 2025 Hospital-acquired infections in the adult intensive care unit: Epidemiology, resistance patterns, and risk factors *J Assoc Physicians India* **73** 51–5
- [3] Pirnay J-P, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, Duinslaeger L, Cornelis P, Zizi M and Vanderkelen A 2003 Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone *J. Clin. Microbiol.* **41** 1192–202
- [4] Richards M J, Edwards J R, Culver D H, Gaynes R P and System N N I S 1999 Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States *Pediatrics* **103** e39–e39
- [5] Weinstein R A, Gaynes R, Edwards J R and System N N I S 2005 Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli *Clinical infectious diseases* **41** 848–54
- [6] Vidaillac C and Chotirmall S H 2021 *Pseudomonas aeruginosa* in bronchiectasis: infection, inflammation, and therapies *Expert Rev. Respir. Med.* **15** 649–62
- [7] Whitfield C and Trent M S 2014 Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides *Annu. Rev. Biochem.* **83** 99–128
- [8] Lam J S, Taylor V L, Islam S T, Hao Y and Kocíncová D 2011 Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide *Front. Microbiol.* **2** 118
- [9] Bystrova O V, Knirel Y A, Lindner B, Kocharova N A, Kondakova A N, Zähringer U and Pier G B 2006 Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46** 85–99
- [10] Nasrin S, Hegerle N, Sen S, Nkeze J, Sen S, Permala-Booth J, Choi M, Sinclair J, Tapia M D and Johnson J K 2022 Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection *BMC Microbiol.* **22** 13
- [11] Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B, Mercier E, Garbino J, Laterre P-F and Koch H 2014 *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes *Crit. Care* **18** R17
- [12] Lee C-R, Lee J H, Park K S, Jeon J H, Kim Y B, Cha C-J, Jeong B C and Lee S H 2017 Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*:

- epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7** 483
- [13] Martin R M and Bachman M A 2018 Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8** 4
- [14] Whitfield C, Kelly S D, Stanton T D, Wyres K L, Clarke B R, Forrester T J B and Kowalczyk A 2025 O-antigen polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*: structures and molecular basis for antigenic diversity *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **89** e00090-23
- [15] Paczosa M K and Mecsas J 2016 *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense *Microbiology and molecular biology reviews* **80** 629–61
- [16] Wyres K L, Lam M and Holt K E 2020 Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* *Nat. Rev. Microbiol.* **18** 344–59
- [17] Arato V, Raso M M, Gasperini G, Berlanda Scorza F and Micoli F 2021 Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat *Int. J. Mol. Sci.* **22** 4042
- [18] Choi M, Hegerle N, Nkeze J, Sen S, Jamindar S, Nasrin S, Sen S, Permala-Booth J, Sinclair J and Tapia M D 2020 The diversity of lipopolysaccharide (O) and capsular polysaccharide (K) antigens of invasive *Klebsiella pneumoniae* in a multi-country collection *Front. Microbiol.* **11** 1249
- [19] Dung T T N, Vinh C, Anh P H, Linh V K P, Tuyen H T, Tam P T, Lan N P H, Phu T T, Tuyet N S M and Nhung P H 2025 The bacterial etiology and antimicrobial susceptibility of lower respiratory tract infections in Vietnam *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **24** 50
- [20] Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, Boccia S, Castillo-Polo J A, Magrini E and Garcia-Vello P 2025 The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance *Lancet Infect. Dis.*
- [21] Duah F, Obeng-Nkrumah N, Egyir B, Opintan J, Duah A, Osei M-M, Baffuor-Asare M and Sampane-Donkor E 2026 Global High-Risk Clones of *Pseudomonas aeruginosa* and Their Antimicrobial Resistance Profiles in Clinical Isolates from Hospitals in Greater Accra, Ghana
- [22] Göpel L, My T N, Kocer K, Pham T A M, Linh L T K, Sy B T, Huber L, Tung T T, The N T and Song L H 2025 Genomic characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from ICU admission screening in Hanoi, Vietnam, 2023 *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **44** 265–71
- [23] Vo T H, Bui Q H, Nguyen H H and Pham H T 2022 Antimicrobial Resistance Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in a Vietnamese Tertiary Care Hospital *Int J Trop Dis* **5** 058
- [24] Ninh T T H, Phương N Q, Hoa N T, Trung N V and Kính N V 2022 ĐẶC ĐIỂM KIỂU GEN CỦA CÁC CHỦNG *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ĐA KHÁNG THUỐC Ở BỆNH NHÂN VÀ MÔI TRƯỜNG KHOA HỒI SỨC TÍCH CỰC BỆNH VIỆN BỆNH NHIỆT ĐỐI TRUNG ƯƠNG *Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam* **2** 18–22
- [25] Truong T P, Tran T T, Le P M, Nguyen V T, Ta T K, Tran T T, Tran C T, Da Le P M, Nguyen Q T and Nguyen T N P 2026 Genomic epidemiology of

- Carbapenem-Resistant Enterobacterales in southern Vietnam: dominance of *Klebsiella pneumoniae* ST16 and horizontal gene transfer *Infez. Med.* **34** 57
- [26] Nguyen N T-Q, Nguyen N P-T, Truong Q T, Huynh T P, Tran-Thi H-N, Hoang M Van and Nguyen-Thi H-Y 2025 Healthcare utilization associated with antimicrobial resistance at a tertiary hospital in Vietnam: A retrospective observational study from 2016 to 2021 *PLoS One* **20** e0329539
- [27] Vu T V D, Choisy M, Do T T N, Nguyen V M H, Campbell J I, Le T H, Nguyen V T, Wertheim H F L, Pham N T, Nguyen V K, van Doorn H R and consortium the V 2021 Antimicrobial susceptibility testing results from 13 hospitals in Viet Nam: VINARES 2016–2017 *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **10** 78
- [28] Ko J-H, Baek J Y, Peck K R, Cho S Y, Ha Y E, Kim S H, Huh H J, Lee N Y, Kang C-I and Chung D R 2017 Discrepant susceptibility to gentamicin despite amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by VITEK 2 represents false susceptibility associated with the *armA* 16S rRNA methylase gene *J. Med. Microbiol.* **66** 1448–50
- [29] Yoon E-J, Lee E H, Hwang D H, Lee H, Baek J-H and Jeong S H 2020 Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by Enterobacterales using MALDI-TOF MS *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **75** 1174–81
- [30] Zelcbuch L, Yitzhaki E, Nissan O, Gidron E, Buchshtab N, Kario E, Kredor-Russo S, Zak N B and Bassan M 2021 Luminescent Phage-Based Detection of *Klebsiella pneumoniae*: From Engineering to Diagnostics *Pharmaceuticals* **14** 347
- [31] Amiri M, Bezaatpour A, Jafari H, Boukherroub R and Szunerits S 2018 Electrochemical methodologies for the detection of pathogens *ACS Sens.* **3** 1069–86
- [32] Thirapanmethree K, Pothisamutyothin K, Nathisuwan S, Chomnawang M T and Wiwat C 2014 Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *bla*CTX-M9 gene for detection of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* *Microbiol. Immunol.* **58** 655–65
- [33] Nguyen T P T, Nguyen N N, Lim D K, Huynh T Q and Nguyen T T H 2024 Development of a loop-mediated amplification (Lamp) assay for detection of environmental *Pseudomonas aeruginosa* *Vietnam Journal of Biotechnology* **22** 616–29
- [34] Li C, Shi Y, Yang G, Xia X, Mao X, Fang Y, Zhang A and Song Y 2019 Establishment of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* *Exp. Ther. Med.* **17** 131–6
- [35] Martzy R, Kolm C, Brunner K, Mach R L, Krska R, Šinkovec H, Sommer R, Farnleitner A H and Reischer G H 2017 A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water *Water Res.* **122** 62–9
- [36] Chen R, Shang H, Niu X, Huang J, Miao Y, Sha Z, Qin L, Huang H, Peng D and Zhu R 2021 Establishment and evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies to goat *Klebsiella pneumoniae* *BMC Vet. Res.* **17** 107

- [37] Kurupati P, Kumarasinghe G and Poh C L 2005 Direct identification of *Pseudomonas aeruginosa* from blood culture bottles by PCR-enzyme linked immunosorbent assay using *oprI* gene specific primers *Mol. Cell. Probes* **19** 417–21
- [38] Hou L, Li D, Zhang N, Zhao J, Zhao Y and Sun X 2022 Development of an isothermal recombinase-aided amplification assay for the rapid and visualized detection of *Klebsiella pneumoniae* *J. Sci. Food Agric.* **102** 3879–86
- [39] Bao J, Ma Y, Ding M, Wang C, Du G, Zhou Y, Guo L, Kang H, Wang C and Gu B 2021 Preliminary exploration on the serum biomarkers of bloodstream infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* based on mass spectrometry *J. Clin. Lab. Anal.* **35** e23915
- [40] e Silva R F, Paixão T R L C, Torres M D T and de Araujo W R 2020 Simple and inexpensive electrochemical paper-based analytical device for sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* *Sens. Actuators B Chem.* **308** 127669
- [41] Ellington A D and Szostak J W 1990 In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands *Nature* **346** 818–22
- [42] Ellington A D and Szostak J W 1990 In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands *Nature* **346** 818–22
- [43] DeRosa M C, Lin A, Mallikaratchy P, McConnell E M, McKeague M, Patel R and Shigdar S 2023 In vitro selection of aptamers and their applications *Nature Reviews Methods Primers* **3** 54
- [44] Sharma T K, Bruno J G and Dhiman A 2017 ABCs of DNA aptamer and related assay development *Biotechnol. Adv.* **35** 275–301
- [45] Chen A and Yang S 2015 Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay *Biosens. Bioelectron.* **71** 230–42
- [46] Kaur H, Bruno J G, Kumar A and Sharma T K 2018 Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines *Theranostics* **8** 4016
- [47] Kalra P, Dhiman A, Cho W C, Bruno J G and Sharma T K 2018 Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity *Front. Mol. Biosci.* **5** 41
- [48] Majdinasab M, Badea M and Marty J L 2022 Aptamer-Based lateral flow assays: Current trends in clinical diagnostic rapid tests *Pharmaceuticals* **15** 90
- [49] Yang L F, Ling M, Kacherovsky N and Pun S H 2023 Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations, *Chem Sci* **14** 4961–78
- [50] Gelinas A D, Davies D R and Janjic N 2016 Embracing proteins: structural themes in aptamer–protein complexes *Curr. Opin. Struct. Biol.* **36** 122–32
- [51] Cai S, Yan J, Xiong H, Liu Y, Peng D and Liu Z 2018 Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets *Analyst* **143** 5317–38
- [52] Kong H Y and Byun J 2013 Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science *Biomol. Ther. (Seoul)*. **21** 423
- [53] Yang Y, Yang D, Schluesener H J and Zhang Z 2007 Advances in SELEX and application of aptamers in the central nervous system *Biomol. Eng.* **24** 583–92
- [54] Zhang Y, Lai B S and Juhas M 2019 Recent advances in aptamer discovery and applications *Molecules* **24** 941

- [55] Khatami S H, Karami S, Siahkouhi H R, Taheri-Anganeh M, Fathi J, Ghadim M B A, Taghvimi S, Shabaninejad Z, Tondro G and Karami N 2022 Aptamer-based biosensors for *Pseudomonas aeruginosa* detection *Mol. Cell. Probes* **101** 865
- [56] Huang R, Xi Z, Deng Y and He N 2016 Fluorescence based Aptasensors for the determination of hepatitis B virus e antigen *Sci. Rep.* **6** 1–7
- [57] Bai H, Wang R, Hargis B, Lu H and Li Y 2012 A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1 *Sensors* **12** 12506–18
- [58] Lee B, Park J-H, Byun J-Y, Kim J H and Kim M-G 2018 An optical fiber-based LSPR aptasensor for simple and rapid in-situ detection of ochratoxin A *Biosens. Bioelectron.* **102** 504–9
- [59] Alsager O A, Alotaibi K M, Alswieleh A M and Alyamani B J 2018 Colorimetric aptasensor of vitamin D3: A novel approach to eliminate residual adhesion between aptamers and gold nanoparticles *Sci. Rep.* **8** 1–12
- [60] Ma X, Xu X, Xia Y and Wang Z 2018 SERS aptasensor for *Salmonella typhimurium* detection based on spiny gold nanoparticles *Food Control* **84** 232–7
- [61] Kim L H, Yu H-W, Kim Y-H, Kim I S and Jang A 2013 Potential of fluorophore labeled aptamers for *Pseudomonas aeruginosa* detection in drinking water *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **56** 165–71
- [62] Zhong Z, Gao X, Gao R and Jia L 2018 Selective capture and sensitive fluorometric determination of *Pseudomonas aeruginosa* by using aptamer modified magnetic nanoparticles *Microchimica Acta* **185** 1–8
- [63] Wang H, Chi Z, Cong Y, Wang Z, Jiang F, Geng J, Zhang P, Ju P, Dong Q and Liu C 2018 Development of a fluorescence assay for highly sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* based on an aptamer-carbon dots/graphene oxide system *RSC Adv.* **8** 32454–60
- [64] Sarabaegi M and Roushani M 2019 A nano-sized chitosan particle based electrochemical aptasensor for sensitive detection of *P. aeruginosa* *Analytical Methods* **11** 5591–7
- [65] Das R, Dhiman A, Kapil A, Bansal V and Sharma T K 2019 Aptamer-mediated colorimetric and electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* utilizing peroxidase-mimic activity of gold NanoZyme *Anal. Bioanal. Chem.* **411** 1229–38
- [66] Graziani A C, Stets M I, Lopes A L K, Schluga P H C, Marton S, Ferreira I M, De Andrade A S R, Krieger M A and Cardoso J 2017 High efficiency binding aptamers for a wide range of bacterial sepsis agents *J. Microbiol. Biotechnol.* **27** 838–43
- [67] Klebes A, Kittel A-S, Verboket R D, von Stetten F and Früh S M 2022 Multianalyte lateral flow immunoassay for simultaneous detection of protein-based inflammation biomarkers and pathogen DNA *Sens. Actuators B Chem.* **355** 131283
- [68] Pintavirooj C, Vongmanee N, Sukjee W, Sangma C and Visitsattapongse S 2022 Biosensors for *Klebsiella pneumoniae* with molecularly imprinted polymer (MIP) technique *Sensors* **22** 4638
- [69] Siu L K, Tsai Y-K, Lin J-C, Chen T-L, Fung C-P and Chang F-Y 2016 Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip for

- rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* serotypes K1 and K2 *J. Clin. Microbiol.* **54** 3018–21
- [70] Ahmadi S, Kamaladini H, Haddadi F and Sharifmoghadam M R 2018 Thiol-capped gold nanoparticle biosensors for rapid and sensitive visual colorimetric detection of *Klebsiella pneumoniae* *J. Fluoresc.* **28** 987–98
- [71] Tominaga T 2018 Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays *J. Microbiol. Methods* **147** 43–9
- [72] Shi D, Li R, Yu S and Qian G 2025 Ultrasensitive Aptamer-Based Metal–Organic Framework-on-Metal–Organic Framework Platform for Clinical Detection of KPC-2 *Klebsiella pneumoniae* and Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* *ACS Infect. Dis.* **11** 2491–9
- [73] Bahadır E B and Sezgintürk M K 2016 Lateral flow assays: Principles, designs and labels *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **82** 286–306
- [74] Majdinasab M, Sheikh-Zeinoddin M, Soleimani-Zad S, Li P, Zhang Q, Li X and Tang X 2015 Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products *Journal of Chromatography B* **974** 147–54
- [75] Sajid M, Kawde A-N and Daud M 2015 Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review *Journal of Saudi Chemical Society* **19** 689–705
- [76] Moyano A, Serrano-Pertierra E, Salvador M, Martínez-García J C, Rivas M and Blanco-López M C 2020 Magnetic lateral flow immunoassays *Diagnostics* **10** 288
- [77] Raysyan A, Galvidis I A, Schneider R J, Eremin S A and Burkin M A 2020 Development of a latex particles-based lateral flow immunoassay for group determination of macrolide antibiotics in breast milk *J. Pharm. Biomed. Anal.* **189** 113450
- [78] Sharma R, Verma A, Shinde N, Mann B, Gandhi K, Wichers J H and van Amerongen A 2021 Adulteration of cow's milk with buffalo's milk detected by an on-site carbon nanoparticles-based lateral flow immunoassay *Food Chem.* **351** 129311
- [79] Wu K-H, Huang W-C, Chang S-C and Shyu R-H 2022 Colloidal silver-based lateral flow immunoassay for detection of profenofos pesticide residue in vegetables *RSC Adv.* **12** 13035–44
- [80] Mao X, Wang W and Du T E 2013 Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip *Talanta* **114** 248–53
- [81] Lee K W, Kim K R, Chun H J, Jeong K Y, Hong D-K, Lee K-N and Yoon H C 2020 Time-resolved fluorescence resonance energy transfer-based lateral flow immunoassay using a raspberry-type europium particle and a single membrane for the detection of cardiac troponin I *Biosens. Bioelectron.* **163** 112284
- [82] Shang Y, Cai S, Ye Q, Wu Q, Shao Y, Qu X, Xiang X, Zhou B, Ding Y and Chen M 2021 Quantum dot nanobeads-labelled lateral flow immunoassay strip for rapid and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* based on strand displacement loop-mediated isothermal amplification *Engineering*

- [83] Xiong J, Sun B, Zhang S, Qin L, Zhang J and Jiang H 2025 A novel one-step immunoassay using mesoporous core-shell Pd@ Pt nanoparticles as an alternative to horseradish peroxidase for amantadine detection *Talanta* **291** 127898
- [84] Liu J, Ruan G, Ma W, Sun Y, Yu H, Xu Z, Yu C, Li H, Zhang C and Li L 2022 Horseradish peroxidase-triggered direct in situ fluorescent immunoassay platform for sensing cardiac troponin I and SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in serum *Biosens. Bioelectron.* **198** 113823
- [85] Busquets M A and Estelrich J 2020 Prussian blue nanoparticles: synthesis, surface modification, and biomedical applications *Drug Discov. Today* **25** 1431–43
- [86] Heikal E A, Rashad R, Alrazzak Hegazi M A, Atef Elgendy H N, Baiuomy I R, Darweesh S K, El-Kholy W A and Ahmed D A 2025 Evaluation of Nano Gold based ELISA for Detection of Hydatid Antigen in Serum Samples of Infected Subjects. *Egyptian Journal of Hospital Medicine* **98**
- [87] Gad W A 2025 Diagnosis of subclinical Staphylococcal aureus bovine mastitis using nanotechnology-based techniques *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* **56** 721–30
- [88] Nejati K, Dadashpour M, Gharibi T, Mellatyar H and Akbarzadeh A 2022 Biomedical applications of functionalized gold nanoparticles: a review *J. Clust. Sci.* **33** 1–16
- [89] Feng L, Zhang J, Yuan J, Hu Y, Liu J and Zhang X 2025 Gold nanoparticles-based colorimetric determination of pharmaceuticals and personal care products: from sensing methodology to application *Appl. Spectrosc. Rev.* **60** 103–36
- [90] Chen Y, Chen R, Wang H, Zhao J, Pan D, Yang L, Tang X and Xiong B 2025 Research advances in SERS-based sensing platforms for multiplex mycotoxin detection in feed *Nanoscale Adv.* **7** 6308–20
- [91] Kim E, Kang M and Ban C 2022 Aptamer-antibody hybrid ELONA that uses hybridization chain reaction to detect a urinary biomarker EN2 for bladder and prostate cancer *Sci. Rep.* **12** 11523
- [92] Wu S-W, Chen Y-J, Chang Y-W, Huang C-Y, Liu B-H and Yu F-Y 2024 Novel enzyme-linked aptamer-antibody sandwich assay and hybrid lateral flow strip for SARS-CoV-2 detection *J. Nanobiotechnology* **22** 5
- [93] Kim G and Yang H 2024 Electrochemical biosensor using direct electron transfer and an antibody–aptamer hybrid sandwich for target detection in complex biological samples *Biosens. Bioelectron.* **253** 116184
- [94] Jarczewska M, Rębiś J, Górski Ł and Malinowska E 2018 Development of DNA aptamer-based sensor for electrochemical detection of C-reactive protein *Talanta* **189** 45–54
- [95] Yao J, Li S, Zhang L, Yang Y, Gopinath S C B, Lakshmipriya T and Zhou Y 2020 Aptamer-antibody dual probes on single-walled carbon nanotube bridged dielectrode: comparative analysis on human blood clotting factor *Int. J. Biol. Macromol.* **151** 1133–8
- [96] Qiu Z, Shen Q, Jiang C, Yao L, Sun X, Li J, Duan C, Li R, Li X and Gopinath S C B 2021 Alzheimer's disease determination by a dual probe on gold nanourchins and nanohorn hybrids *Int. J. Nanomedicine* 2311–22

- [97] Zuker M 2003 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction *Nucleic Acids Res.* **31** 3406–15
- [98] Sarzynska J, Popena M, Antczak M and Szachniuk M 2023 RNA tertiary structure prediction using RNAComposer in CASP15 *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **91** 1790–9
- [99] Jo S, Kim T, Iyer V G and Im W 2008 CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM *J. Comput. Chem.* **29** 1859–65
- [100] Schrödinger L 2016 Schrödinger 2016.4
- [101] Abraham M J, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith J C, Hess B and Lindah E 2015 Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers *SoftwareX* **1–2** 19–25
- [102] Huang J and Mackerell A D 2013 CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data *J. Comput. Chem.* **34** 2135–45
- [103] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, Impey R W and Klein M L 1983 Comparison of simple potential functions for simulating liquid water *J. Chem. Phys.* **79** 926–35
- [104] Darden T, York D and Pedersen L 1993 Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems *J. Chem. Phys.* **98** 10089–92
- [105] Hess B, Bekker H, Berendsen H J C and Fraaije J G E M 1997 LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations *J. Comput. Chem.* **18** 1463–72
- [106] Bussi G, Donadio D and Parrinello M 2007 Canonical sampling through velocity rescaling *Journal of Chemical Physics* **126**
- [107] Berendsen H J C, Postma J P M, Van Gunsteren W F, Dinola A and Haak J R 1984 Molecular dynamics with coupling to an external bath *J. Chem. Phys.* **81** 3684–90
- [108] Ke Q, Gong X, Liao S, Duan C and Li L 2022 Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations *J. Mol. Liq.* **365**
- [109] Genheden S and Ryde U 2015 The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities *Expert Opin. Drug Discov.* **10** 449–61
- [110] Valdés-Tresanco M S, Valdés-Tresanco M E, Valiente P A and Moreno E 2021 Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS *J. Chem. Theory Comput.* **17** 6281–91
- [111] Miller B R, McGee T D, Swails J M, Homeyer N, Gohlke H and Roitberg A E 2012 MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations *J. Chem. Theory Comput.* **8** 3314–21
- [112] Humphrey W, Dalke A and Schulten K 1996 VMD: visual molecular dynamics *J. Mol. Graph.* **14** 33–8
- [113] Pham T T, Le T K, Huyen N T T, Luyen Van N, Nguy T P, Tran D L and Truong T N L 2023 Staining-Enhanced Peroxidase-Mimicking Gold Nanoparticles in Nano-ELISA for Highly Sensitive Detection of *Klebsiella pneumoniae* *ACS Omega* **8** 49211–7
- [114] Turkevich J, Stevenson P C and Hillier J 1951 A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold *Discuss. Faraday Soc.* **11** 55–75

- [115] Abbott M, Hayward S, Ross W, Godefroy S B, Ulberth F, Van Hengel A J, Roberts J, Akiyama H, Popping B and Yeung J M 2010 Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices *J. AOAC Int.* **93** 442–50
- [116] Marimuthu C, Tang T-H, Tominaga J, Tan S-C and Gopinath S C B 2012 Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation *Analyst* **137** 1307–15
- [117] Musheev M U and Krylov S N 2006 Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue. *Anal. Chim. Acta* **564** 91–6
- [118] Heiat M, Ranjbar R, Latifi A M, Rasaee M J and Farnoosh G 2017 Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64** 541–8
- [119] Low S Y, Hill J E and Peccia J 2009 A DNA aptamer recognizes the Asp f 1 allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386** 544–8
- [120] Zhang H-L, Lv C, Li Z-H, Jiang S, Cai D, Liu S-S, Wang T and Zhang K-H 2023 Analysis of aptamer-target binding and molecular mechanisms by thermofluorimetric analysis and molecular dynamics simulation *Front. Chem.* **11** 1144347
- [121] Autiero I and Vitagliano L 2023 Enhanced molecular dynamic simulation studies unravel long-range effects caused by sequence variations and partner binding in RNA aptamers *Mol. Ther. Nucleic Acids* **34**
- [122] Muhammad M, Shao C sheng and Huang Q 2021 Aptamer-functionalized Au nanoparticles array as the effective SERS biosensor for label-free detection of interleukin-6 in serum *Sens. Actuators B Chem.* **334**
- [123] Han X, Qin M, Lu X, Wang Q, Zhang Y and Wang Z 2025 A highly sensitive SERS aptasensor using a novel truncated aptamer for the detection of Deoxynivalenol *Sens. Actuators B Chem.* **424**
- [124] Lu Y, Zhong J, Yao G and Huang Q 2018 A label-free SERS approach to quantitative and selective detection of mercury (II) based on DNA aptamer-modified SiO₂@Au core/shell nanoparticles *Sens. Actuators B Chem.* **258** 365–72
- [125] Cialla-May D, Bonifacio A, Markin A, Markina N, Fornasaro S, Dwivedi A, Dib T, Farnesi E, Liu C, Ghosh A, Schmitt M and Popp J 2024 Recent advances of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) in optical biosensing *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **181**
- [126] Rubin S, Nguyen P H L and Fainman Y 2021 The effect of DNA bases permutation on surface-enhanced Raman scattering spectrum **10** 1581–93
- [127] Safar W, Azziz A, Edely M and Lamy de la Chapelle M 2023 Conventional Raman, SERS and TERS Studies of DNA Compounds *Chemosensors* **11**
- [128] Fan X, Zhang Z, Liu Z, Cao Y, Zhang T, Feng B, Liu F, Qu F, Zhang S and Zhao W 2026 Aptamer-engineered SERS sensors: molecular recognition meets plasmonic enhancement for precision detection *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118664

- [129] Li X, Shen L, Zhang D, Qi H, Gao Q, Ma F and Zhang C 2008 Electrochemical impedance spectroscopy for study of aptamer–thrombin interfacial interactions *Biosens. Bioelectron.* **23** 1624–30
- [130] Ebrahimi M, Johari-Ahar M, Hamzeiy H, Barar J, Mashinchian O and Omid Y 2012 Electrochemical impedance spectroscopic sensing of methamphetamine by a specific aptamer. *Bioimpacts* **2** 91–5
- [131] Harris A R, Carter P, Cowan R and Wallace G G 2021 Impact of Protein Fouling on the Charge Injection Capacity, Impedance, and Effective Electrode Area of Platinum Electrodes for Bionic Devices *ChemElectroChem* **8** 1078–90
- [132] Zhou J and Rossi J 2017 Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges *Nat. Rev. Drug Discov.* **16** 181–202
- [133] Kim S E, Su W, Cho M, Lee Y and Choe W S 2012 Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin *Anal. Biochem.* **424** 12–20
- [134] Kohlberger M and Gadermaier G 2022 SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection *Biotechnol. Appl. Biochem.* **69** 1771–92
- [135] Ngoc B V T, Brisse S, Tuyet T D, Viet D V T, Holt K E, Vu T N, Kieu H T T, Ngoc D N T, van Doorn H R and Wertheim H F L 2025 *Klebsiella pneumoniae* with capsule type K64 is overrepresented among invasive disease in Vietnam *F1000Res.* **10** 454
- [136] Lorenz R, Bernhart S H, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler P F and Hofacker I L 2011 ViennaRNA Package 2.0 *Algorithms for Molecular Biology* **6** 26
- [137] Pham T T, Le T-K, Huyen N T T, Luyen Van N, Nguy T P, Tran D L and Truong T N L 2023 Staining-Enhanced Peroxidase-Mimicking Gold Nanoparticles in Nano-ELISA for Highly Sensitive Detection of *Klebsiella pneumoniae* *ACS Omega* **8** 49211–7
- [138] Liu R, Li J, Salena B J and Li Y 2025 Aptamer and DNAzyme based colorimetric biosensors for pathogen detection *Angew. Chem. Int. Ed.* **64** e202418725
- [139] Cao H, Lai Y, Bougouffa S, Xu Z and Yan A 2017 Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *BMC Genomics* **18** 459
- [140] Ding X, Xu C, Zheng B, Yu H and Zheng P 2024 Molecular Mechanism of Interaction between DNA Aptamer and Receptor-Binding Domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants Revealed by Steered Molecular Dynamics Simulations *Molecules* **29** 2215
- [141] Soundy J and Day D 2017 Selection of DNA aptamers specific for live *Pseudomonas aeruginosa* *PLoS One* **12** e0185385
- [142] Hao Y, King J D, Huszczyński S, Kocíncová D and Lam J S 2013 Five new genes are important for common polysaccharide antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* *mBio* **4** 10–1128
- [143] Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, Tamm M, François B, Mercier E, Garbino J, Laterre P-F and Koch H 2014 *Pseudomonas aeruginosa* serotypes

- in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes *Crit. Care* **18** R17
- [144] Zheng X, Gao S, Wu J and Hu X 2020 Recent advances in aptamer-based biosensors for detection of *Pseudomonas aeruginosa* *Front. Microbiol.* **11** 605229
- [145] Yeh Y-C, Creran B and Rotello V M 2012 Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology *Nanoscale* **4** 1871–80
- [146] Yazdani S, Daneshkhah A, Diwate A, Patel H, Smith J, Reul O, Cheng R, Izadian A and Hajrasouliha A R 2021 Model for gold nanoparticle synthesis: Effect of pH and reaction time *ACS Omega* **6** 16847
- [147] Lou D, Tian Y, Zhang Y, Yin J, Yang T, He C, Ma M, Yu W and Gu N 2018 Peroxidase-like activity of gold nanoparticles and their gold staining enhanced ELISA application *J. Nanosci. Nanotechnol.* **18** 951–8
- [148] Liu B and Liu J 2017 Surface modification of nanozymes *Nano Res.* **10** 1125–48
- [149] Minic R and Zivkovic I 2020 Optimization, Validation and Standardization of ELISA *Norovirus* ed G Mózsik (Rijeka: IntechOpen) p Ch. 2
- [150] Liu Y, Wang C, Cai N, Long S and Yu F 2014 Negatively charged gold nanoparticles as an intrinsic peroxidase mimic and their applications in the oxidation of dopamine *J. Mater. Sci.* **49** 7143–50
- [151] Li R S, Liu H, Chen B Bin, Zhang H Z, Huang C Z and Wang J 2016 Stable gold nanoparticles as a novel peroxidase mimic for colorimetric detection of cysteine *Analytical Methods* **8** 2494–501
- [152] Zhao D, Chen C, Lu L, Yang F and Yang X 2015 A label-free colorimetric sensor for sulfate based on the inhibition of peroxidase-like activity of cysteamine-modified gold nanoparticles *Sens. Actuators B Chem.* **215** 437–44
- [153] Jiang C, Zhu J, Li Z, Luo J, Wang J and Sun Y 2017 Chitosan–gold nanoparticles as peroxidase mimic and their application in glucose detection in serum *RSC Adv.* **7** 44463–9
- [154] Chang Y, Zhang Z, Hao J, Yang W and Tang J 2016 BSA-stabilized Au clusters as peroxidase mimetic for colorimetric detection of Ag⁺ *Sens. Actuators B Chem.* **232** 692–7
- [155] Zhang S, Li H, Wang Z, Liu J, Zhang H, Wang B and Yang Z 2015 A strongly coupled Au/Fe₃O₄/GO hybrid material with enhanced nanozyme activity for highly sensitive colorimetric detection, and rapid and efficient removal of Hg²⁺ in aqueous solutions *Nanoscale* **7** 8495–502
- [156] Zheng C, Ke W, Yin T and An X 2016 Intrinsic peroxidase-like activity and the catalytic mechanism of gold@ carbon dots nanocomposites *RSC Adv.* **6** 35280–6
- [157] Presnova G V, Zhdanov G A, Filatova L Y, Ulyashova M M, Presnov D E and Rubtsova M Y 2022 Improvement of Seed-Mediated Growth of Gold Nanoparticle Labels for DNA Membrane-Based Assays *Biosensors (Basel)*. **13** 2
- [158] Brown K R and Natan M J 1998 Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces *Langmuir* **14** 726–8

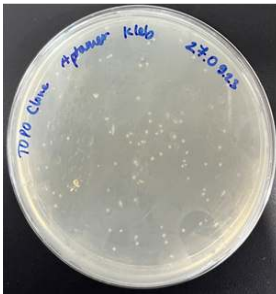
- [159] Conrad M, Proll G, Builes-Münden E, Dietzel A, Wagner S and Gauglitz G 2023 Tools to compare antibody gold nanoparticle conjugates for a small molecule immunoassay *Microchimica Acta* **190** 62
- [160] Tripathi K and Driskell J D 2018 Quantifying bound and active antibodies conjugated to gold nanoparticles: A comprehensive and robust approach to evaluate immobilization chemistry *ACS Omega* **3** 8253–9
- [161] Pintavirooj C, Vongmanee N, Sukjee W, Sangma C and Visitsattapongse S 2022 Biosensors for *Klebsiella pneumoniae* with molecularly imprinted polymer (MIP) technique *Sensors* **22** 4638
- [162] da Silva Junior A G, Frias I A M, Lima-Neto R G, Franco O L, Oliveira M D L and Andrade C A S 2022 Electrochemical detection of gram-negative bacteria through mastoparan-capped magnetic nanoparticle *Enzyme Microb. Technol.* **160** 110088
- [163] Soares A R, Afonso R, Martins V C, Palos C, Pereira P, Caetano D M, Carta D and Cardoso S 2022 On-site magnetic screening tool for rapid detection of hospital bacterial infections: Clinical study with *Klebsiella pneumoniae* cells *Biosens. Bioelectron. X* **11** 100149
- [164] Tayebbeh F, Amani J, Nazarian S, Moradyar M and Mirhosseini S A 2016 Molecular diagnosis of clinically isolated *Klebsiella pneumoniae* strains by PCR-ELISA *Journal of Applied Biotechnology Reports* **3** 501–5
- [165] Chen R, Shang H, Niu X, Huang J, Miao Y, Sha Z, Qin L, Huang H, Peng D and Zhu R 2021 Establishment and evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies to goat *Klebsiella pneumoniae* *BMC Vet. Res.* **17** 1–10
- [166] Zhang L, Shi Y, Chen C, Han Q, Zhang M, Yi H, Song Y, Xia X and Zhang J 2019 Visual and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* by magnetic immunocapture-loop-mediated isothermal amplification assay *Jundishapur J. Microbiol.* **12**
- [167] Wang Y, Yan W, Wang Y, Xu J and Ye C 2018 Rapid, sensitive and reliable detection of *Klebsiella pneumoniae* by label-free multiple cross displacement amplification coupled with nanoparticles-based biosensor *J. Microbiol. Methods* **149** 80–8
- [168] Pintavirooj C, Vongmanee N, Sukjee W, Sangma C and Visitsattapongse S 2022 Biosensors for *Klebsiella pneumoniae* with molecularly imprinted polymer (MIP) technique *Sensors* **22** 4638
- [169] Pan Q, Luo F, Liu M and Zhang X-L 2018 Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases *Journal of Infection* **77** 83–98
- [170] Biriukov D, Fibich P and Předota M 2020 Zeta potential determination from molecular simulations *The Journal of Physical Chemistry C* **124** 3159–70
- [171] Clogston J D and Patri A K 2010 Zeta potential measurement *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (Springer) pp 63–70
- [172] Delgado A V, González-Caballero F, Hunter R J, Koopal L K and Lyklema J 2005 Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena *Pure Appl. Chem* **77** 1753–805

- [173] Kirby B J and Hasselbrink Jr E F 2004 Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations *Electrophoresis* **25** 187–202
- [174] Bhattacharjee S 2016 DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release* **235** 337–51
- [175] Bhattacharjee S 2016 DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release* **235** 337–51
- [176] Liu X, Atwater M, Wang J and Huo Q 2007 Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands *Colloids Surf. B Biointerfaces* **58** 3–7
- [177] Wei H and Wang E 2013 Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes *Chem. Soc. Rev.* **42** 6060–93
- [178] Jazayeri M H, Amani H, Pourfatollah A A, Pazoki-Toroudi H and Sedighimoghaddam B 2016 Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies *Sens. Biosensing Res.* **9** 17–22
- [179] Kumar S, Aaron J and Sokolov K 2008 Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties *Nat. Protoc.* **3** 314–20
- [180] Roberts A, Prakashan D, Dhanze H, Gandham R K, Gandhi S and Sharma G T 2022 Immuno-chromatic probe based lateral flow assay for point-of-care detection of Japanese encephalitis virus NS1 protein biomarker in clinical samples using a smartphone-based approach *Nanoscale Adv.* **4** 3966–77
- [181] Deb A, Gogoi M, Mandal T K, Sinha S and Pattader P S G 2023 Specific Instantaneous Detection of Klebsiella pneumoniae for UTI Diagnosis with a Plasmonic Gold Nanoparticle Conjugated Aptasensor *ACS Appl. Bio Mater.* **6** 3309–18
- [182] Elhosseiny N M, Samir T M, Ali A A, El-Kholy A A and Attia A S 2021 Development of an immunochromatographic strip using conjugated gold nanoparticles for the rapid detection of klebsiella pneumoniae causing neonatal sepsis *Pharmaceutics* **13** 1141
- [183] Sharma R, Lakshmi G, Kumar A and Solanki P 2022 Polypyrrole based molecularly imprinted polymer platform for klebsiella pneumonia detection *ECS Sensors Plus* **1** 010603
- [184] Siu L K, Tsai Y-K, Lin J-C, Chen T-L, Fung C-P and Chang F-Y 2016 Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of Klebsiella pneumoniae serotypes K1 and K2 *J. Clin. Microbiol.* **54** 3018–21
- [185] Elhosseiny N M, Samir T M, Ali A A, El-Kholy A A and Attia A S 2021 Development of an immunochromatographic strip using conjugated gold nanoparticles for the rapid detection of klebsiella pneumoniae causing neonatal sepsis *Pharmaceutics* **13** 1141
- [186] Niu L, Zhao F, Chen J, Nong J, Wang C, Wang J, Gao N, Zhu X, Wu L and Hu S 2018 Isothermal amplification and rapid detection of Klebsiella pneumoniae based on the multiple cross displacement amplification (MCDA) and gold nanoparticle lateral flow biosensor (LFB) *PLoS One* **13** e0204332

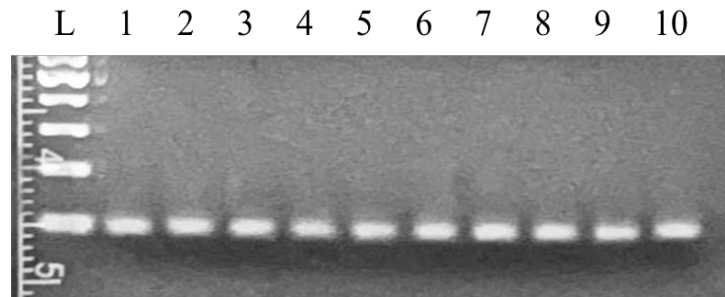
- [187] Kanehara R, Tonouchi A, Konno K and Hashimoto M 2021 Cyclohumulanoid Sesquiterpenes from the Culture Broth of the Basidiomycetous Fungus *Daedaleopsis tricolor* *Molecules* **26**
- [188] Vishwakarma A, Meganathan Y and Ramya M 2023 Aptamer-based assay for rapid detection, surveillance, and screening of pathogenic *Leptospira* in water samples *Sci. Rep.* **13** 13379
- [189] Yang H, Wang Y, Yang Q, Fan H, Wang L, Zhang T, Li Z, Liu G, Zhao P and Wu H 2021 A rapid and sensitive detection method for *Pseudomonas aeruginosa* using visualized recombinase polymerase amplification and lateral flow strip technology *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11** 698929
- [190] Zhao F, Niu L, Nong J, Wang C, Wang J, Liu Y, Gao N, Zhu X, Wu L and Hu S 2018 Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* using multiple cross displacement amplification and gold nanoparticle-based lateral flow biosensor visualization *FEMS Microbiol. Lett.* **365** fny147
- [191] Tu Z, Yang X, Dong H, Yu Q, Zheng S, Cheng X, Wang C, Rong Z and Wang S 2022 Ultrasensitive fluorescence lateral flow assay for simultaneous detection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* via wheat germ agglutinin-functionalized magnetic quantum dot nanoprobe *Biosensors (Basel)*. **12** 942
- [192] Dou L, Bai Y, Liu M, Shao S, Yang H, Yu X, Wen K, Wang Z, Shen J and Yu W 2022 ‘Three-To-One’ multi-functional nanocomposite-based lateral flow immunoassay for label-free and dual-readout detection of pathogenic bacteria *Biosens. Bioelectron.* **204** 114093

PHỤ LỤC

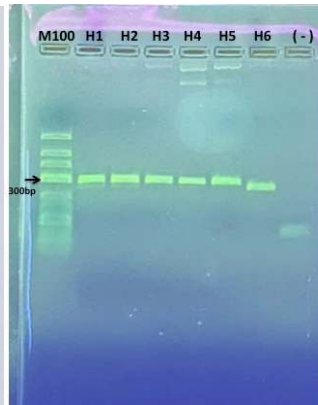
A



B



Phụ lục 1. (A) Đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL kanamycin sau khi được ủ qua đêm ở 37 °C với *TOP10 E. coli* chứa plasmid. (B) Các khuẩn lạc bất kỳ được lựa chọn ngẫu nhiên và nuôi trong môi trường LB lỏng qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Sau khi thu được plasmid, các đoạn plasmid sẽ được kiểm tra bằng phản ứng bằng PCR với các đoạn mồi đặc hiệu của aptamer và điện di trên gel agarose 2%. “L” là thang chuẩn DNA 100 bp.



Phụ lục 2. (A) Đĩa thạch LB chứa 50 µg/mL kanamycin sau khi được ủ qua đêm ở 37° C với *DH5α E. coli* chứa plasmid. (B) Các khuẩn lạc bất kỳ được lựa chọn ngẫu nhiên và nuôi trong môi trường LB lỏng qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Sau khi thu được plasmid, các đoạn plasmid sẽ được kiểm tra bằng phản ứng bằng PCR với các đoạn mồi đặc hiệu của aptamer và điện di trên gel agarose 2%. “L” là thang chuẩn DNA 100 bp.