

Nghiên cứu tổng hợp nano vàng và khảo sát khả năng gắn kết với kháng thể kháng vi khuẩn E. coli O157

• Ngô Võ Kế Thành

• Nguyễn Đăng Giang

Trung tâm Nghiên cứu và Đào tạo Thiết kế Vi mạch, ĐHQG-HCM

• Lâm Quang Vinh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

• Huỳnh Thành Đạt

Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 06 tháng 06 năm 2013, nhận đăng ngày 03 tháng 9 năm 2013)

TÓM TẮT

Phương pháp khử hóa học sử dụng muối sodium citrate (Na_3Ct) để chế tạo hạt nano vàng từ axit cloroauric ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) và gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn E. coli O157 lên trên hạt nano vàng được mô tả trong bài báo này. Các phương pháp phân tích như phổ hấp thụ (UV-Vis) và kính hiển vi truyền qua (Transmission electron microscopy-TEM) được ứng dụng để đánh giá các tính chất của các hạt nano vàng. Kết

quả phổ UV-Vis cho biết nồng độ muối Na_3Ct là một yếu tố quan trọng trong quy trình tổng hợp và có ảnh hưởng quan trọng đến kích thước hạt nano vàng. Từ hình TEM các mẫu nano vàng cho biết kích thước hạt nano được phân bố từ 10-20 nm. Hơn thế nữa, khả năng gắn kết giữa kháng thể kháng vi khuẩn E. coli O157 với hạt nano vàng chế tạo ra được chứng minh thông qua hình TEM và phổ UV-Vis.

Từ khóa: Hạt nano vàng, vi khuẩn E. coli O157, kháng thể, tác nhân gây bệnh

MỞ ĐẦU

Các hạt nano vàng với những đặc tính như không độc, dễ tương tác sinh học và có các tính chất quang học và điện tử đặc biệt, điều này theo các tài liệu tham khảo cho biết do hiệu ứng kích thước lượng tử ("quantum-sized effect") tạo nên, đang thu hút nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước trong việc đưa các hạt nano này ứng dụng trong các lĩnh vực y sinh học như chẩn đoán, cảm biến, lâm sàng [1-5].

Vấn đề mà các nhà khoa học đang quan tâm là tạo ra các hạt nano vàng có kích thước nhỏ, phân bố kích thước đồng đều và đáp ứng yêu cầu trong việc gắn kết với các phân tử sinh học nhằm

triển khai ứng dụng các hạt nano này vào các lĩnh vực khác nhau đặc biệt ứng dụng trong việc làm tăng độ nhạy trong cảm biến sinh học sử dụng linh kiện vi cân tinh thể thạch anh (QCM) trong phát hiện các vi khuẩn độc hại và các mục đích khác trong y sinh [6-7]. Phương pháp phân tích này so với các phương pháp phân tích sinh học thông thường như đếm tế bào trên kính hiển vi, đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch, đầu dò enzym, ELISA, kit chuẩn PCR có các ưu điểm như: phát hiện vi khuẩn ở nồng độ thấp, thời gian thử nghiệm nhanh và chính xác [8].

Hiện nay tại Việt Nam, vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm là vấn đề hết sức quan trọng và cần thiết vì ảnh hưởng đến trực tiếp đến sức khỏe con người mà còn gây thiệt hại về kinh tế, là gánh nặng cho gia đình và xã hội. Theo thống kê của Cục An Toàn Thực Phẩm – Bộ Y Tế Việt Nam, hơn 5.500 người ngộ độc thực phẩm năm 2012 ở Việt Nam. Có nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra ngộ độc thực phẩm, trong đó nguyên nhân do ô nhiễm vi sinh vật chiếm tỉ lệ khá cao. Một trong những vi sinh vật gây bệnh được chú ý nhiều nhất là *E. coli* O157 vì là nguyên nhân gây ra các bệnh tiêu chảy nặng, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng tiết niệu và viêm màng não trẻ sơ sinh [9-10].

Trong công việc hiện tại, chúng tôi tiến hành chế tạo hạt nano vàng bằng phương pháp đơn giản nhất dùng Na_3Ct khử $\text{HAuCl}_4.3\text{H}_2\text{O}$ [11] dưới sự gia nhiệt bằng bếp từ. Bên cạnh đó, khả năng gắn kết các hạt nano vàng sau khi chế tạo ra với kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 được đánh giá bằng phổ hấp thụ (UV-Vis) và kính hiển vi truyền qua (TEM).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu và hóa chất

Các hóa chất cho quá trình thực nghiệm bao gồm: Muối Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; độ tinh khiết 99%) do Trung Quốc sản xuất với độ tinh khiết 99%, Axit chloroauric ($\text{HAuCl}_4.3\text{H}_2\text{O}$; độ tinh khiết 99%), Nước khử ion (DI water; độ tinh khiết 100%), Dung dịch PBS (PH = 7,2) được cung cấp bởi hãng Sigma-Aldrich – Đức. Kháng thể đơn dòng (IgM) từ chuột kháng kháng nguyên K99 pilus trên vi khuẩn *E. coli* O157 (sc-57711) được cung cấp từ hãng Santa Cruz Biotechnology-Mỹ do đại lý công ty Biorad-Mỹ tại Việt Nam nhập hàng.

Phương pháp chế tạo

Tổng hợp dung dịch nano vàng

Lấy 1ml dung dịch HAuCl_4 nồng độ 5.10^{-3} M cho vào 18 ml nước DI, khuấy mạnh và gia nhiệt

ở nhiệt độ 100°C cho đến khi dung dịch này bắt đầu sôi. Tiến hành tiếp tục cho dung dịch Na_3Ct với các nồng độ thay đổi trong khoảng 0,5-1% (w/v) vào dung dịch đang khuấy. Sau một khoảng thời gian phản ứng có sự chuyển màu sang màu đỏ đậm, đây chính là màu của dung dịch hạt nano vàng. Sau đó tắt gia nhiệt, khuấy bình thường chờ dung dịch nguội về nhiệt độ phòng. Thêm nước vào cho đủ 20 ml. Mẫu chế tạo ra được bọc bằng giấy bạc và cho vào tủ lạnh ở 4°C .

Gắn kết các hạt nano vàng với kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157

Lấy 0,1ml dung dịch nano vàng với nồng độ 25 μM cho vào trong một ống đựng kháng thể kháng *E. coli* O157:H7 với thể tích 0,1 ml và nồng độ giảm từ 25 μM đến 10 μM , lắc nhẹ khoảng 30 phút, để trong bóng tối, ở nhiệt độ 4°C khoảng 8-16h. Sau đó, dung dịch được đi quay li tâm lạnh 15000 rpm trong 30 phút, lấy kết tủa màu đỏ cho vào trong dung dịch PBS ($C_M=0,1\text{M}$), li tâm lại rồi lọc lấy kết tủa đỏ hòa tan vào trong dung dịch PBS ($C_M=0,1\text{M}$). Tất cả quy trình gắn kết kháng thể lên hạt nano Au được thực hiện trong tủ vô trùng ở Phòng thí nghiệm vi sinh thuộc trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Các dung dịch nano vàng sau khi gắn kháng thể sẽ được bảo quản trong môi trường vô trùng với nhiệt độ là 4°C .

Các kỹ thuật phân tích

Các mẫu dung dịch nano vàng chế tạo ra và các mẫu gắn kết giữa hạt nano vàng với kháng thể kháng *E. coli* O157 được phân tích bằng phổ UV-Vis trên hệ máy Cary 100 Conc của hãng Varian tại Phòng thí nghiệm bán dẫn thuộc Khu công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh (SHTP). Kích thước và hình dạng của hạt nano vàng cũng như mẫu gắn kết được đo bằng thiết bị kính hiển vi truyền qua (TEM của hãng JEM model 1400, 100kV).

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

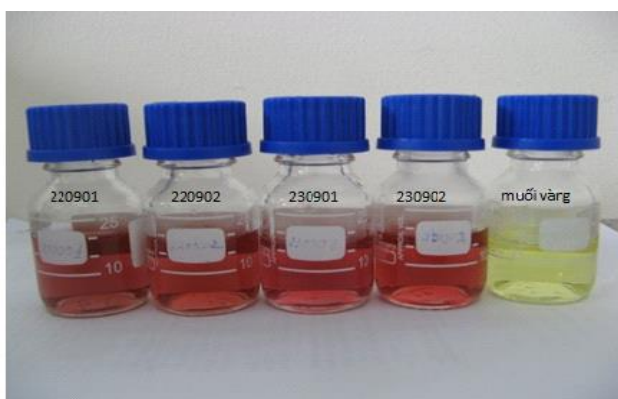
Tổng hợp hạt nano vàng

Nhằm xác định sự ảnh hưởng của chất khử đến kích thước hạt nano vàng, nồng độ chất khử Na_3Ct được thay đổi từ 0,5 đến 1% (w/v) cho quá trình tổng hợp, các thông số khác của quá trình

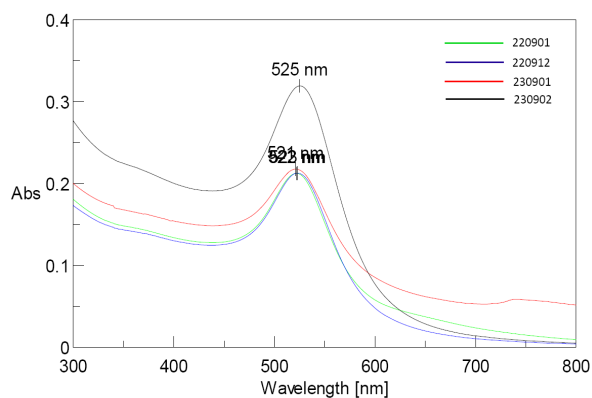
phản ứng tổng hợp được cố định. Toàn bộ các thông số và hình ảnh của quá trình phản ứng được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Thành phần và điều kiện chế tạo các dung dịch Nano Au

Mẫu	Dd HAuCl_4 (M)	Dd $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (%)	H_2O (ml)	Tốc độ khuấy (rpm)	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian (h)
220901	$5 \cdot 10^{-3}$	0,5	18	550	100	3
220902	$5 \cdot 10^{-3}$	0,6	18	550	100	3
230901	$5 \cdot 10^{-3}$	0,8	18	550	100	3
230902	$5 \cdot 10^{-3}$	1	18	550	100	3



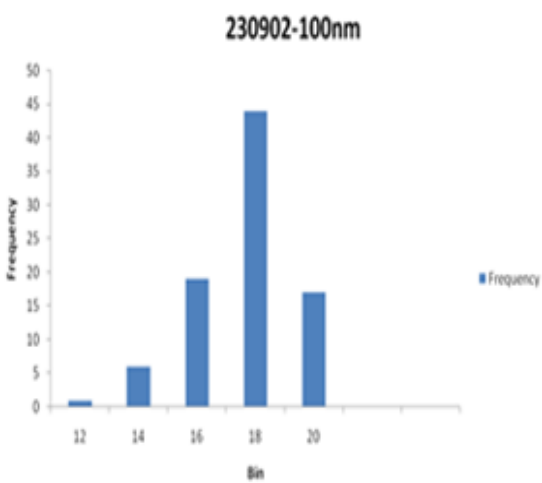
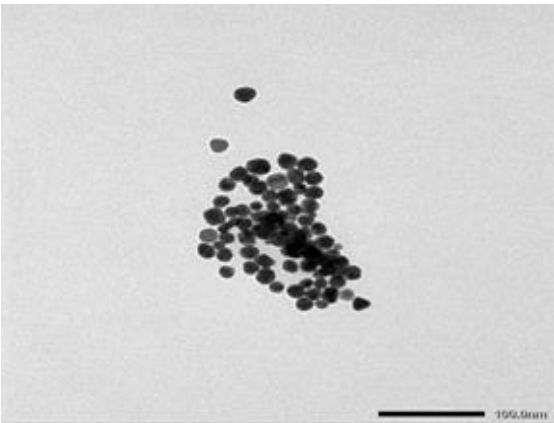
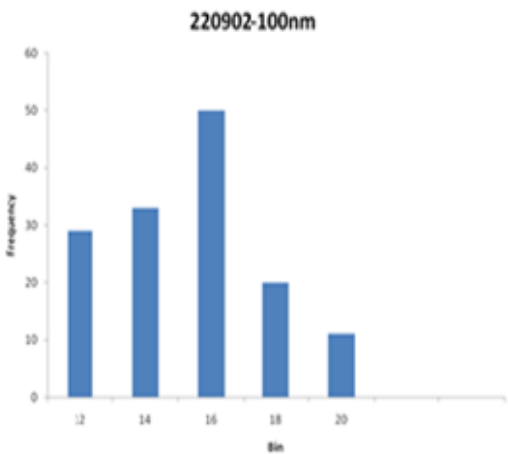
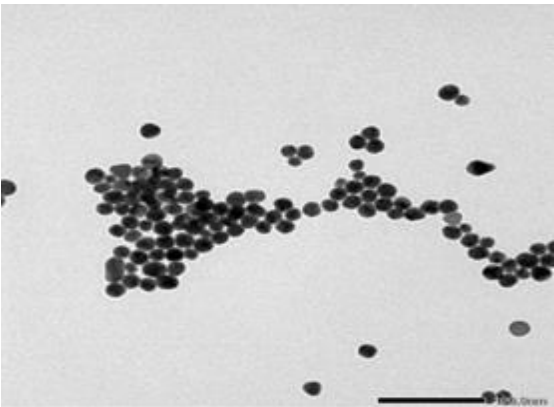
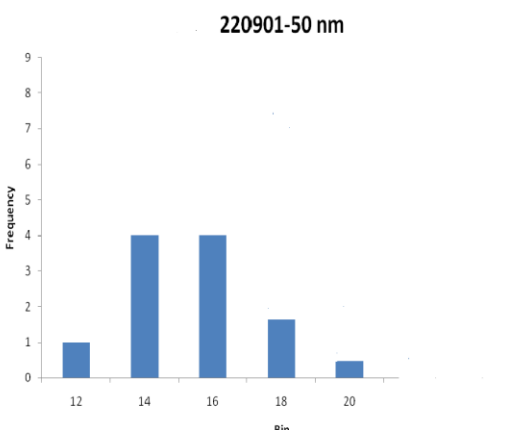
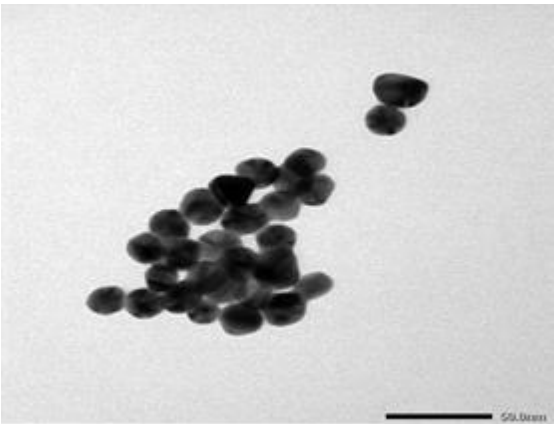
Hình 1. Sự thay đổi màu sắc của dung dịch Nano Au



Hình 2. Phổ hấp thụ UV-Vis của các dung dịch Nano Au đã điều chế được với các nồng độ chất khử khác nhau

Các kết quả phổ hấp thụ UV-Vis của quá trình tổng hợp hạt nano vàng được phân tích ở Hình 2. Bên cạnh đó, kết quả kích thước và hình dạng của hạt nano vàng được xác định bằng hình TEM được trình bày ở Hình 3.

Từ hình dạng phổ UV-Vis của các dung dịch nano vàng được chế tạo ra với các nồng độ chất khử khác nhau (Hình 2) cho thấy các dung dịch nano vàng đã được chế tạo thành công do có bước sóng hấp thụ cực đại dao động từ 521-525 nm [12]. Ngoài ra, với các kết quả chụp ảnh TEM các mẫu dung dịch nano vàng ở Hình 3 đã chứng minh hình dạng các hạt nano vàng có dạng hình cầu với độ đồng đều cao và kích thước hạt nano vàng dao động từ 14 đến 18 nm.



Hình 3. Hình dạng và kích thước hạt nano vàng

Dựa vào sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại của phổ UV-Vis (Hình 2) từ 521 nm tăng lên 525 nm và kích thước hạt nano vàng (Hình 3) tăng lên từ 14 nm đến 18 nm đã cho thấy khi tăng nồng độ chất khử dẫn đến tăng kích thước hạt nano vàng. Điều này có thể giải thích từ cơ chế của quá trình tạo ra hạt keo nano vàng bằng phương pháp hóa học sử dụng chất khử Na_3Ct trải qua 3 giai đoạn liên tiếp cho quá trình hình thành hạt keo nano vàng bao gồm: tạo mầm, keo tụ và hình thành hình dạng hạt nano vàng [13, 14]. Giai đoạn ban đầu của phản ứng, các hạt cơ bản nano vàng được hình thành từ các mầm tinh thể để từ đó hình thành lên các hạt keo nano

vàng. Sau quá trình tạo mầm, các hạt cơ bản nano vàng kết tụ lại với nhau nhờ lực hút Van Der Waals. Giai đoạn cuối cùng phản ứng, hình dạng cầu của các hạt nano vàng được hình thành từ quá trình kết tụ lại bởi hiện tượng lán chiếm Ostwald ripening của các hạt cơ bản nano vàng [15]. Chính lực đẩy của ion khử Na_3Ct làm đẩy nhanh quá trình hình thành nhiều các hạt cơ bản nano vàng dẫn đến làm tăng quá trình kết tụ và ổn định bề mặt hạt nano vàng. Đây chính là nguyên nhân làm tăng kích thước và đạt nhanh trạng thái ổn định của dung dịch nano vàng [15].

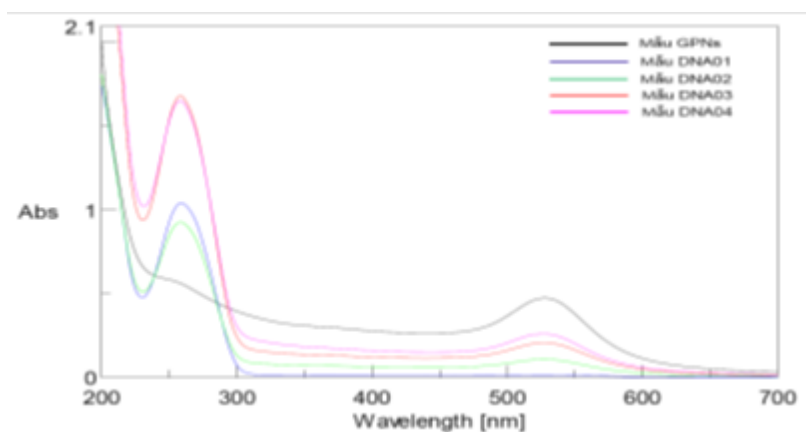
Gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 lên trên hạt nano vàng

Bảng 2. Thành phần các dung dịch nano vàng gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157:H7

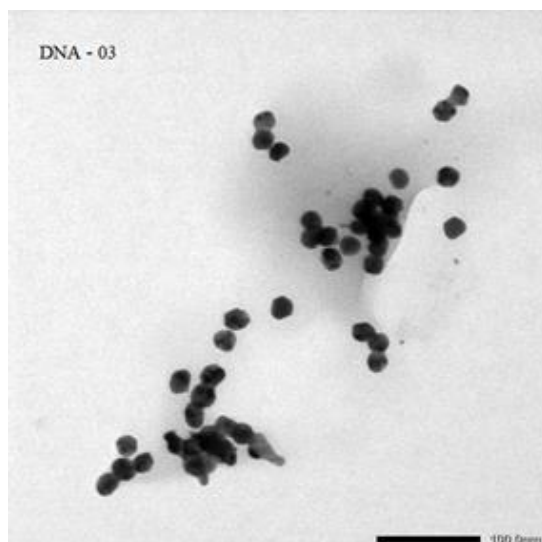
Thành phần	Mẫu				
	GNPS	DNA01	DNA02	DNA03	DNA04
Nano vàng (μM)	25	25	25	25	25
Kháng thể vi khuẩn <i>E. coli</i> O157:H7 (μM)	0	25	20	15	10

Nhằm xác định khả năng gắn kết giữa kháng thể kháng kháng vi khuẩn *E. coli* O157 với hạt nano vàng, nồng độ kháng thể được cho thay đổi theo như Bảng 2. Các kết quả phổ UV-Vis của

dung dịch nano vàng sau khi gắn kết với kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Phổ UV-Vis các dung dịch nano vàng đã gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157



Hình 5. Dung dịch nano vàng gắn kết kháng thể vi khuẩn *E. coli* O157

Hình 4 là kết quả đo phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch nano vàng đã gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 và dung dịch nano vàng chưa gắn kết kháng thể. Trên đồ thị xuất hiện đỉnh hấp thụ tại bước sóng 260 nm, đây là đỉnh hấp thụ đặc trưng của kháng thể vi khuẩn *E. coli* O157. Ngoài ra còn có đỉnh hấp thụ của dung dịch nano vàng đã gắn kết ở 529 nm, nhưng các đỉnh này thấp hơn, rộng hơn và bị dịch về phía phải khoảng 5 nm so với mẫu không gắn kết kháng thể [16]. Điều đó chứng tỏ các kháng thể đã gắn lên trên bề mặt của các hạt nano vàng. Dựa trên đồ thị ta thấy chiều cao của đỉnh hấp thụ ở 529 nm thay đổi khi tỉ lệ nồng độ giữa dung dịch nano vàng và kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 thay đổi. Tỉ lệ này càng tăng thì đỉnh hấp thụ càng thấp và khi đạt tỉ lệ 1:1 thì không

còn xuất hiện đỉnh này. Điều này là do tỉ lệ nồng độ kháng thể lớn hơn rất nhiều so với lượng hạt nano vàng, nên các kháng thể bao phủ gần như hoàn toàn bề mặt của hạt nano vàng làm cho đỉnh hấp thụ đặc trưng của hạt nano vàng không xuất hiện trên phổ. Tất cả được chứng minh qua hình TEM được chụp bởi 2 mẫu DNA01 và DNA02 như trình bày ở Hình 5.

KẾT LUẬN

Trong bài báo này, dung dịch nano vàng đã được chế tạo thành công với dạng hình cầu, kính thước hạt nano vàng dao động từ 10-20 nm bằng phương pháp khử hóa học với việc sử dụng chất khử muối sodium citrate và gia nhiệt thông thường. Bên cạnh đó, chúng tôi đã thành công trong việc gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 lên hạt nano vàng. Điều này đã được chứng minh thông qua các hình TEM (Hình 5) và các kết quả từ phổ hấp thụ UV-Vis khảo sát sự gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 lên hạt nano vàng với sự xuất hiện đỉnh hấp thụ tại bước sóng 260 nm của kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157 và đỉnh hấp thụ của hạt nano vàng sau khi gắn kháng thể tại bước sóng 529 nm. Đỉnh hấp thụ của dung dịch nano vàng đã gắn kết kháng thể có hình dạng thấp hơn, rộng hơn và bị dịch về phía phải khoảng 5 nm so với mẫu dung dịch nano vàng không gắn kết kháng thể kháng vi khuẩn *E. coli* O157.

Study on synthesis of colloidal gold nanoparticles and preparation of anti-*E. coli* O157 monoclonal antibody conjugated nanoparticles

• Ngo Vo Ke Thanh

• Nguyen Dang Giang

Integrated Circuit Design Research & Education Center, VNU-HCM

• Lam Quang Vinh

University of Science, VNU-HCM

• Huynh Thanh Dat

Vietnam National University of Ho Chi Minh City

ABSTRACT

*The present paper describes the preparation of colloidal gold nanoparticles by a chemical reduction method, using some chemical compounds such as sodium citrate (Na₃Ct), chlorauric acid (HAuCl₄.3H₂O) and anti-*E. coli* O157 monoclonal antibody-conjugated gold nanoparticles. The nanoparticles were characterized by several techniques including Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy (UV-Vis),*

*Transmission Electron Microscopy (TEM). The UV-Vis confirmed that the concentration of Na₃Ct has a major effect on the size of the synthesized gold nanoparticles, and TEM images showed that the size of gold particles is in the range of 10-20 nm. In addition, the binding of the antibody-gold conjugates to *E. coli* O157 was also investigated using the same characterization means.*

Keywords: Gold nanoparticles, antibody, pathogen detection, *E. coli* O157.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A.Henglein, Physicochemical properties of small metal particles in solution: "Microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition, *Journal of Physical chemistry*, 97, 5457 (1993).
- [2]. G.T. Wei, F.K. Liu and C.R.C. Wang, Shape Separation of Nanometer Gold Particles by Size-Exclusion Chromatography, *Analytical chemistry*, 71, 2085-2091 (1999).
- [3]. P. Alexandridis, Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology, Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers, *Chemical Engineering Technology*, 34, 15-28 (2011).
- [4]. I.W.A.E. Katz, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications, *Chem. Int. Ed*, 43, 6042-6108 (2004).

- [5]. X. Qian, X.H. Peng, D.O. Ansari, Y.G. Qiqin, G.Z. Chen, D.M. Shin, L. Yang, In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nature Biotechnology*, 26, 83–90 (2008).
- [6]. M.C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecularchemistry, quantum-size-related properties, and applications toward, *Chem. Rev.*, 104, 293–346 (2004).
- [7]. S.J. Park, T.A. Taton, C.A. Mirkin, Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes, *Science*, 295, 1503–1506 (2002).
- [8]. D.G. Li, A nanobeads amplified QCM immunosensor for the detection of avian influenza virus H5N1, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4146–4154 (2011).
- [9]. M.M.M. Adams, Food microbiology, RSC, 2008.
- [10]. <http://vfa.gov.vn/so-lieu-bao-cau/so-vu-ngo-doc-thuc-pham-nam-2012-197.vfa>. [Accessed 3 9 2013].
- [11]. J. Turkevich, *Trans Faraday Soc*, 11, 55–75 (1951).
- [12]. E. Hao, R.C. Bailey, G.C. Schatz, J.T. Hupp, S. Li, Synthesis and Optical Properties of “Branched” Gold Nanocrystals, *Nano Letters*, 4, 327–330 (2004).
- [13]. L. Pei, K. Mori, M. Adachi, Formation Process of Two Dimensional Networked Gold Nanowires by Citrate Reduction of and the Shape Stabilization, *Langmuir*, 20, 7837–7843 (2004).
- [14]. B.K. Pong, H.I. Elim, J.X. Chong, W. Ji, B.L. Trout, J.Y. Lee, New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (III) salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties, *J Phys Chem*, 111, 6281–6287 (2007).
- [15]. S. Biggs, P. Mulvaney, C.F. Zukoski, F. Grieser, Study of anion Adsorption at the gold-aqueous solution interface by AFM, *J. Am. Chem. Soc* 116, 9150–9157 (1994).
- [16]. X. Zhao, X. He, W. Li, Y. Liu, L. Yang, J. Wang, Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157: H7, *African Journal of Microbiology Research*, 4, 663–670 (2010).