

Nghiên cứu biến đổi bề mặt Au bởi hợp chất thiol để ứng dụng trong cảm biến sinh học

- Phan Thanh Nhật Khoa
- Nguyễn Trung Thành
- Phan Văn Tuấn
- Phạm Văn Bình
- Phạm Xuân Thanh Tùng
- Lê Thị Thanh Tuyền
- Tống Duy Hiên

Phòng Thí nghiệm Công nghệ Nano, ĐHQG-HCM

(Nhận bài ngày 11 tháng 01 năm 2016, đăng bài ngày 29 tháng 11 năm 2016)

TÓM TẮT

Trong cảm biến sinh học dựa trên cơ sở thanh dao động, bề mặt Au đóng vai trò quan trọng, vừa là bề mặt để chùm laser phản xạ, vừa là nơi có thể thực hiện các bước biến đổi bề mặt để đặc hiệu hóa cảm biến. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu và khảo sát biến đổi bề mặt Au với hợp chất cysteamine và glutaraldehyde để biến đổi bề mặt Au trở nên có thể phản ứng được với các hợp chất có nhóm chức amine. Nồng độ của cysteamine, thời gian xử lý với cysteamine và thời gian xử lý

với glutaraldehyde đã được nghiên cứu để tìm được các thông số thích hợp. Các phương pháp phản ứng tạo màu với xúc tác enzyme horseradish peroxidase (HRP) và phương pháp đo góc tiếp xúc đã được kết hợp nhằm tối ưu hóa. Kết quả cho thấy sử dụng cysteamine 5 mM trong dung môi ethanol, thời gian xử lý cysteamine 16 giờ, thời gian xử lý glutaraldehyde 1 giờ sẽ cho bề mặt Au có khả năng phản ứng tối ưu nhất với các hợp chất có nhóm amine.

Từ khóa: góc tiếp xúc, thanh dao động, cysteamine, glutaraldehyde, horseradish peroxidase

MỞ ĐẦU

Cảm biến thanh dao động hiện nay đang thu hút được sự chú ý của các nhà nghiên cứu như là một cảm biến có tiềm năng ứng dụng đa dạng: có khả năng sử dụng làm cảm biến khí, cảm biến phát hiện vi khuẩn [1, 2], phát hiện thuốc [3] phát hiện chất nổ [4]. Craighead và các cộng sự [2] trong năm 2011 lần đầu tiên đã chứng minh khả năng phát hiện vi khuẩn *E. coli* sử dụng cảm biến thanh dao động và sau đó vào năm 2003 phát hiện được *Salmonella enterica* được công bố. Trong công trình nghiên cứu phát hiện *Salmonella enterica*, khi vi khuẩn bị bắt giữ trên bề mặt thanh đã tạo ra ứng suất và khiến thanh dao động bị uốn cong. Tuy nhiên, để thanh dao động trở thành cảm biến sinh học giai đoạn đầu tiên là phải hoạt hóa, biến đổi bề

mặt thanh dao động để gắn các thụ thể chuyên biệt với kháng nguyên (đối tượng cần nhận diện) lên bề mặt thanh. Tùy theo loại vật liệu của cảm biến mà phương pháp biến đổi bề mặt được lựa chọn cho thích hợp. Đối với các bề mặt có chứa Si, thí dụ như SiO₂, SiN và Si, thông thường trong bước đầu tiên hợp chất silane, thí dụ như 3-glycidoxypopyl trimethoxysilane [15] 3-glycidoxypopyl triethoxysilane, 3-aminopopyl - triethoxysilane (APTES) được chọn để xử lý bề mặt. Trong nghiên cứu này, thanh dao động được chế tạo bằng vật liệu silicon nitride trên đế wafer Si. Mặt trên của thanh có phủ một lớp màng mỏng Cr và Au nhằm tăng độ phản xạ, việc này tạo sự thuận lợi cho việc

đo độ lệch của thanh, vì bản thân màng mỏng SiN_x trong suốt và không phản xạ ánh sáng.

Nhằm hướng đến ứng dụng thanh dao động làm cảm biến nano sinh học phát hiện các chỉ thị ung thư, đặc biệt là ung thư gan với các chỉ thị sinh học như alpha fetoprotein (AFP) [5], AFP-L3 (một đồng phân của AFP) [6], golgi protein 73 (GP73) [7], Dickkopf-related protein, des-gamga-carboxyprothrombin (DCP)...Việc gắn kết các kháng thể của các chỉ thị này lên bề mặt thanh dao động là một việc làm cần thiết, tạo tiền đề cho việc hoàn thiện một cảm biến sinh học với cấu trúc thanh dao động nano. Do đó, nhóm tác giả đã nghiên cứu, biến đổi bề mặt Au nhằm gắn kết các phân tử sinh học (kháng thể) lên thanh dao động nano. Trong bài báo này, chúng tôi đã khảo sát biến đổi bề mặt Au của thanh dao động với cysteamine và glutaraldehyde, qua đó bề mặt Au chứa các nhóm chức aldehyde, có khả năng phản ứng với các nhóm amine trong phân tử kháng thể. Trên bề mặt Au càng cố định được nhiều kháng thể thì cảm biến càng có độ nhạy cao. Do đó việc nghiên cứu tìm các điều kiện thích hợp trong việc biến đổi bề mặt Au, bao gồm nồng độ của cysteamine, thời gian xử lý với cysteamine, thời gian xử lý với GAD là trọng tâm của nghiên cứu này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chúng tôi sử dụng 2 phương pháp chính để đánh giá các kết quả khảo sát gồm: phương pháp đo góc tiếp xúc và phương pháp đo phổ UV-Vis.

Phương pháp đo góc tiếp xúc được sử dụng để khảo sát tính chất của bề mặt Au qua mỗi bước biến đổi bề mặt. Bề mặt Au ban đầu có góc tiếp xúc khoảng $21-22^\circ$. Sau khi hình thành lớp cysteamine trên bề mặt, do nhóm chức amine ($-\text{NH}_2$) có tính phân cực nên xảy ra tương tác giữa nhóm amine và phân tử H_2O trong giọt nước, từ đó tương tác giữa bề mặt phiến và nước cũng thay đổi. Bề mặt trở nên ái nước hơn và góc tiếp xúc giảm đi, như sẽ trình bày trong phần kết quả và thảo

luận. Bước gắn kết glutaraldehyde sau đó tạo ra các nhóm chức CHO, và bước gắn kết HRP tạo ra lớp protein trên bề mặt phiến, tiếp tục làm góc tiếp xúc giữa nước và bề mặt thay đổi. Do đó, sử dụng phương pháp này cũng góp phần đánh giá mức độ thành công của các bước biến đổi bề mặt.

Phương pháp đo phổ UV-Vis được sử dụng để kiểm tra chất lượng của bước gắn kết cysteamine và GAD. Việc này được đánh giá bằng cách cố định enzyme horseradish peroxidase (HRP) lên bề mặt Au sau khi gắn GAD, và cho mẫu vào lọ dung dịch chứa muối 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS) không màu và H_2O_2 . HRP sẽ xúc tác phản ứng oxy hóa khử giữa ABTS và H_2O_2 , sinh ra dạng ABTS bị oxy hóa có màu xanh, hấp thụ mạnh ở bước sóng 420 nm [17, 18, 19]. Cường độ hấp thụ của dung dịch càng cao thì chứng tỏ bề mặt Au đã gắn kết được nhiều HRP và giữ được hoạt tính sinh học của HRP, và như vậy là thích hợp cho việc gắn kết các protein.

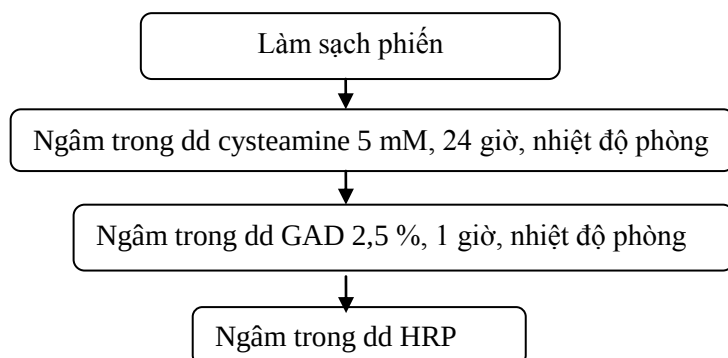
Thí nghiệm được thực hiện và tối ưu hóa trên các phiến wafer silicon có phủ màng mỏng SiN (1000 nm) và sau đó là màng mỏng Au (20 nm). Các phiến được chế tạo từ Phòng Thí nghiệm Công nghệ Nano- Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi tìm được các thông số thích hợp của quy trình gắn cysteamine và GAD trên phiến Si/ SiN /Au, chúng tôi sử dụng điều kiện thích hợp đó và tiến hành trên chip thanh dao động.

Đầu tiên, acetone (Merck) và ethanol (Merck) được sử dụng để làm sạch mẫu, loại bỏ các hợp chất hữu cơ và bụi bẩn bám vào. Sau đó, ngâm mẫu trong dung dịch cysteamine 5 mM với dung môi là ethanol (Sigma Aldrich), pha ở nhiệt độ phòng. Sau đó đem mẫu ra rửa sạch bằng ethanol (Merck), và chuyển vào ngâm trong dung dịch GAD (Sigma Aldrich) nồng độ 2,5 % trong nước khử ion ở nhiệt độ phòng. Rửa lại mẫu bằng nước khử ion.

Sau bước gắn GAD, để đánh giá và tối ưu hóa 2 bước gắn cysteamine và GAD, mẫu được ngâm

trong dung dịch HRP (Sigma Aldrich) trong đệm PBS với pH bằng 7,4 ở 4 °C. Rửa lại phiến bằng đệm phosphate buffered saline (PBS) và đem ngâm phiến vào lọ chứa ABTS (Sigma Aldrich) và H₂O₂

(Sigma Aldrich) với tỉ lệ 1mM:1mM. Sau 24 h, lấy mẫu ra, đưa dung dịch vào cuvet và đo phổ hấp thụ bằng quang phổ kế UV-Vis Cary100 (Varian).



Hình 1. Sơ đồ biến đổi bề mặt Au

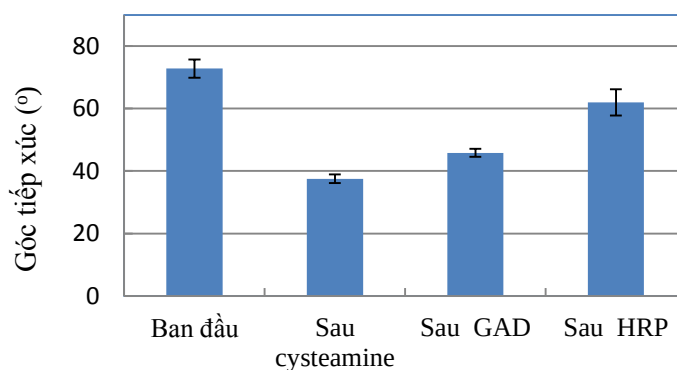
Để đo góc tiếp xúc giữa nước và bề mặt Au, chúng tôi sử dụng máy đo góc tiếp xúc CAM0 (KVS Instrument, Phần Lan).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tính chất ái nước của bề mặt Au

Để tiến hành thí nghiệm này, phiến Si/SiN/Au cần có diện tích lớn, để giọt nước có thể lan ra mà không gặp cản trở ở vùng biên của phiến. Do đó thí nghiệm được tiến hành trên phiến Si/SiN phủ Au có kích thước 10x10 mm². Nước khử ion được sử

dụng để nhỏ giọt trong thí nghiệm. Thiết bị CAM110 chụp ảnh giọt nước trên phiến và sau khi xử lý ảnh sẽ xuất ra góc tiếp xúc. Kết quả đo góc tiếp xúc được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Kết quả đo góc tiếp xúc nước

Từ kết quả, có thể thấy qua các giai đoạn biến đổi bề mặt, có sự thay đổi rõ rệt góc tiếp xúc. Góc tiếp xúc tăng dần qua các giai đoạn. Ban đầu bề mặt Au có tính ái nước kém (góc tiếp xúc lớn hơn

70°). Sau khi gắn cysteamine và GAD lên, các nhóm chức -NH₂, -CHO có tính phân cực và chúng tương tác với phân tử H₂O phân cực, cho nên bề mặt phiến có tính ái nước nhiều hơn, mà theo

nguyên lý bề mặt càng ái nước thì giá trị góc tiếp xúc càng nhỏ, trong điều kiện thí nghiệm này góc tiếp xúc của các bề mặt có các nhóm chức $-NH_2$ và $-CHO$ lần lượt là $37,5 (\pm 1,4)$ và $45,8 (\pm 1,3)$. Số liệu góc tiếp xúc của nước sau khi gắn cysteamine nhỏ hơn góc tiếp xúc sau khi gắn GAD, nguyên nhân có thể do độ phân cực khác nhau giữa nhóm chức CHO và nhóm chức NH_2 .

Sau khi cố định HRP lên, góc tiếp xúc tăng đến khoảng 64° , chứng tỏ vẫn có tương tác giữa protein HRP và phân tử nước nên bề mặt phiên vẫn mang tính ái nước (góc tiếp xúc nhỏ). Tuy nhiên, tính ái nước là kém nhiều so với bề mặt chỉ mới có cysteamine hoặc GAD. Do đó, bề mặt có HRP có giá trị góc tiếp xúc lớn hơn so với bề mặt có cysteamine và GAD (giá trị góc tiếp xúc là $62 \pm 4,2$ so với $37,5 \pm 1,4$ và $45,8 (\pm 1,3)$). Có thể nguyên nhân là trong phân tử HRP có chứa các amine acid thơm không phân cực làm giảm tính ái nước của bề mặt.

Qua mỗi thí nghiệm, góc tiếp xúc có sự biến đổi lớn, từ đó chứng tỏ các giai đoạn biến đổi bề mặt đã tạo ra các lớp phân tử hóa học, sinh học trên bề mặt wafer.

Phản ứng tạo màu

Để đánh giá protein đã cố định lên bề mặt Au sau bước gắn kết GAD hay không, enzyme HRP đã được sử dụng. Lọ dung dịch chứa cơ chất và H_2O_2

có sự đổi màu càng mạnh là có ngâm phiên Si/SiN/Au gắn kết được nhiều HRP nhất và giữ được hoạt tính sinh học của protein nhất, và từ đó có thể đánh giá chất lượng gắn kết cysteamine và GAD là tốt nhất. Trong các khảo sát sau đây, mỗi thí nghiệm được tiến hành trên 3 phiên Si/SiN/Au với kích thước $2 \times 4 \text{ mm}^2$ để lấy giá trị trung bình của cường độ hấp thụ tại 420 nm.

Trong bước xử lý bề mặt Au với cysteamine và GAD, có nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến chất lượng gắn kết cysteamine và GAD. Nồng độ của dung dịch cysteamine, thời gian xử lý, loại dung môi để pha cysteamine, thời gian ngâm GAD và nồng độ GAD... đều có ảnh hưởng tới chất lượng lớp cysteamine và GAD. Tuy nhiên, phạm vi bài này chỉ tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ cysteamine, thời gian xử lý cysteamine và thời gian xử lý GAD.

Ảnh hưởng của nồng độ cysteamine

Trong thí nghiệm này, các phiên Si/SiN/Au được ngâm trong dung dịch cysteamine với nồng độ lần lượt là 1 mM, 5 mM, 10 mM và 300 mM trong 16 h. Sau đó tất cả các mẫu đều được ngâm GAD 2,5 % trong 1 h và ngâm HRP 10 U trong 16 h. Sau khi rửa sạch, các phiên được ngâm vào các lọ chứa dung dịch ABTS và H_2O_2 . Sau 24 h, dung dịch trong các lọ được đem đo phổ UV-Vis.



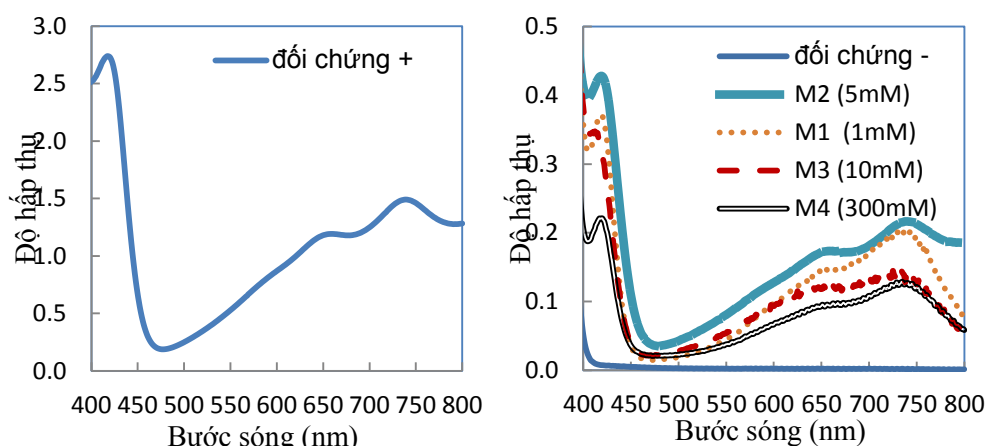
Hình 3. Lọ dung dịch ABTS+ H_2O_2 của thí nghiệm đối chứng âm (trái) và đối chứng dương (phải)

Hình 3 cho thấy lọ dung dịch đối chứng âm (chỉ chứa cơ chất và H_2O_2 , không ngâm phiên), thì sau 24 h màu sắc vẫn trong suốt, và phổ UV-Vis cũng có cường độ hấp thụ rất bé ($0,003$) tại bước

sóng 420 nm. Điều này chứng tỏ rằng cơ chất ABTS và H_2O_2 hầu như không hề phản ứng với nhau khi không có mặt sự xúc tác của enzym HRP. Điều ngược lại xảy ra đối với mẫu đối chứng

dương (lọ dung dịch chứa ABTS và H_2O_2 , sau đó được nhỏ giọt trực tiếp 10 U HRP): màu sắc của lọ đổi qua màu xanh nhanh chóng và sau 24 h, lọ hoàn toàn trở nên xanh đen, và phổ UV-Vis có cường độ hấp thụ đến 2,625 tại 420 nm. Điều này chứng minh rằng khi có mặt enzyme HRP (ở dạng hòa tan trong dung dịch ABTS và H_2O_2) đã xúc tác và làm cho tốc độ phản ứng giữa ABTS và H_2O_2

tăng nhiều lần. Nếu xem rằng tốc độ phản ứng tỉ lệ thuận với cường độ hấp thụ tại 420 nm, thì có thể nói sự có mặt của 10 U HRP đã làm tăng tốc độ phản ứng lên hơn 800 lần. Từ đó, có thể dự đoán rằng các lọ dung dịch ngâm các phiên Si/SiN/Au có gắn HRP, thì ABTS và H_2O_2 đã phản ứng với nhau nhanh hơn lọ đối chứng âm, và cường độ phổ hấp thụ cũng cao hơn.



Hình 4. Phổ UVVis của lọ đối chứng dương (A) và các lọ khảo sát theo nồng độ cysteamine (B)

Các lọ dung dịch có ngâm phiên được gắn HRP đều cho màu xanh lục, từ nhạt đến đậm. Qua phổ UV-Vis cho thấy, lọ có ngâm phiên xử lý với cysteamine 5 mM có cường độ hấp thụ 0,442 tại bước sóng 420 nm, mạnh hơn 147 lần so với mẫu đối chứng âm (nhưng vẫn yếu hơn nhiều so với mẫu đối chứng dương, điều này là hiển nhiên vì lọ đối chứng dương có trộn vụn 10 U HRP, và HRP tồn tại ở dạng hòa tan, có ở khắp trong lọ, còn lọ ngâm phiên thì chỉ có lượng HRP bám trên phiên, và HRP bị cố định, không di chuyển khắp dung dịch được). Điều này chứng tỏ có HRP gắn trên bề mặt mẫu thí nghiệm đã xúc tác cho H_2O_2 oxy hóa ABTS làm dung dịch từ không màu chuyển sang màu xanh lục.

Các lọ còn lại cũng chuyển màu xanh, tuy nhiên ở 420 nm hấp thụ yếu hơn so với mẫu M2. Như vậy nồng độ 5 mM là thích hợp nhất cho khâu xử lý cysteamine. Như vậy, nếu sử dụng cysteamine với nồng độ quá thấp hoặc quá cao đều

không tốt. Nguyên nhân của việc chất lượng lớp cysteamine không cao ở nồng độ thấp (1 M) có thể là do nồng độ thấp khiến mật độ cysteamine bám lên bề mặt Au không nhiều, dẫn đến mật độ GAD phản ứng với nhóm NH_2 của cysteamine cũng thấp, và kết quả cuối cùng là mật độ HRP bám lên bề mặt Au cũng thấp. Còn ở nồng độ quá cao của cysteamine, có thể là do GAD có 2 nhóm aldehyde giống nhau ở hai đầu bề mặt Au có quá nhiều nhóm chức NH_2 nằm sát nhau, và trong quá trình xử lý GAD, một số phân tử GAD có cả hai đầu liên kết với hai nhóm NH_2 gần nhau, và phân tử GAD đó không còn có khả năng phản ứng và giữ lại protein trên bề mặt nữa. Tuy nhiên, nguyên nhân này cần được kiểm chứng thêm bằng các phương pháp đo đặc khác có khả năng đánh giá định hướng của phân tử GAD nằm trên bề mặt Au và trạng thái liên kết hay chưa liên kết của nhóm CHO [20]

Ảnh hưởng của thời gian xử lý cysteamine

Trong thí nghiệm này, các phiên đều được ngâm cysteamine 5 mM nhưng qua những khoảng thời gian khác nhau: 1 h, 2 h, 4 h và 16 h. Sau đó,

tất cả các mẫu được ngâm trong GAD rồi tới HRP với những điều kiện giống nhau.

Bảng 1. Độ hấp thu tại 420 nm trong khảo sát theo thời gian xử lý cysteamine

Nghiem thức	Độ hấp thu
Đối chứng âm	0,004 ± 0,003
CT1 (1 h)	0,058 ± 0,008
CT2 (2 h)	0,105 ± 0,017
CT3 (4 h)	0,292 ± 0,018
CT4 (16 h)	0,464 ± 0,026
Đối chứng dương	2,705 ± 0,041

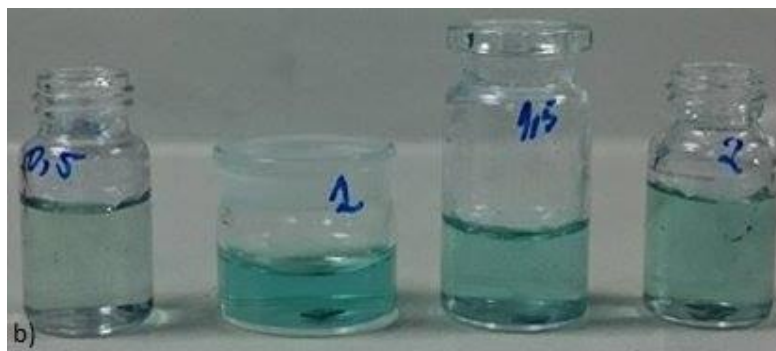
Mẫu đối chứng âm cũng không có hấp thu tại 420 nm và mẫu đối chứng dương hấp thu mạnh tại 420 nm. Bảng 1 cho thấy các mẫu từ M1 đến M4 đều đổi màu, trong đó mẫu M4 đổi màu mạnh nhất, cường độ hấp thu đạt tới 0,464. Như vậy, có thể cho rằng thời gian ngâm cysteamine càng dài thì càng có nhiều phân tử cysteamine bám lên bề mặt phiên và do đó sẽ gắn được nhiều GAD và HRP. Mẫu ngâm cysteamine 16 h cho kết quả tốt nhất.

Chúng tôi không khảo sát việc ngâm cysteamine trong thời gian dài hơn có thể dẫn đến tăng hay giảm khả năng gắn kết protein trên Au. Có thể qua thời gian ngâm lâu hơn sẽ tạo ra nhiều nhóm chức NH_2 và trong bước tiếp theo có một số phân tử GAD sẽ phản ứng cả 2 nhóm chức CHO của nó với 2 nhóm NH_2 lân cận, làm giảm khả năng cố định protein trên bề mặt Au. Có nhiều nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát sự tạo thành

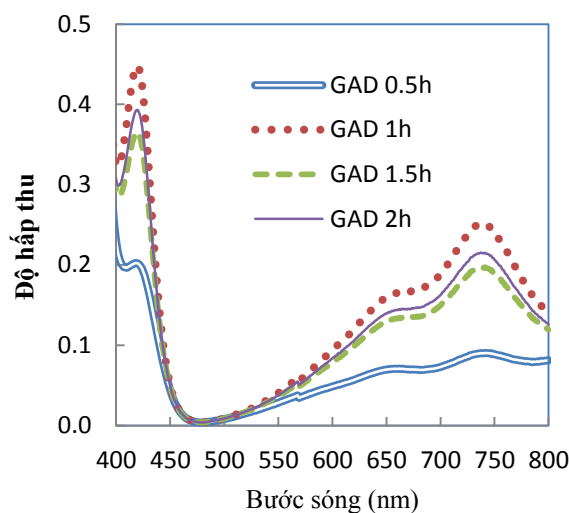
lớp cysteamine trên Au trong các khoảng thời gian dài hơn (đến một tháng), tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi không tiến hành khảo sát thời gian dài, vì mục tiêu đặt ra là biến đổi bề mặt cảm biến để hướng tới phục vụ xét nghiệm và cho kết quả chẩn đoán trong thời gian nhanh nhất có thể.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý GAD

Để đạt được hiệu quả cố định enzyme HRP trên bề mặt Au cao hơn nữa, thời gian ngâm GAD cũng được tiến hành khảo sát. Sau khi ngâm cysteamine 5 mM qua đêm (16 h), các mẫu tiếp tục được ngâm trong GAD 2,5 % với các thời gian lần lượt là 0,5 giờ; 1 giờ; 1,5 giờ và 2 giờ. Sau đó ngâm trong HRP với điều kiện giống nhau. Cuối cùng thực hiện phản ứng màu trong các dung dịch ABTS và H_2O_2 .



Hình 5. Kết quả phản ứng màu theo thời gian ngâm GAD



Hình 6. Phổ UV-Vis các lọ ngâm phiên khảo sát theo thời gian xử lý GAD

Hình 5 và Bảng 2 cho thấy tất cả các lọ dung dịch có ngâm phiên Si/SiN/Au gắn HRP đều chuyển màu xanh. Có một điểm đáng chú ý là không phải phiên ngâm GAD trong thời gian càng dài thì chất lượng gắn kết HRP càng tăng cao: phiên M3 và M4 với thời gian ngâm GAD quá dài đều xúc tác không tốt bằng phiên M2 ngâm GAD trong 1 h. Như vậy, thời gian ngâm GAD 1 h là thích hợp. Nguyên nhân của sự tối ưu này có thể là trong thời gian bắt đầu phản ứng ngâm GAD, một

trong 2 nhóm chức CHO của GAD phản ứng với nhóm chức NH_2 của cysteamine gắn trên bề mặt Au, nhóm CHO còn lại vẫn còn tự do và sẽ gắn kết với nhóm amine của HRP và cố định HRP lên bề mặt Au. Tuy nhiên, nếu như thời gian ngâm GAD quá lâu, có thể các nhóm CHO ở đầu tự do của GAD sẽ có khả năng phản ứng với nhóm NH_2 của cysteamine lân cận, và như vậy cả phân tử GAD đó không còn nhóm CHO tự do để có thể gắn kết và cố định HRP lên bề mặt nữa.

Bảng 2. Độ hấp thu tại 420 nm của kết quả phản ứng màu theo thời gian ngâm GAD

Nghiem thức	Độ hấp thu (Abs)
Đối chứng âm	0,004 ± 0,003
GT1 (0,5 h)	0,201 ± 0,015
GT2 (1 h)	0,448 ± 0,022
GT3 (1,5 h)	0,385 ± 0,022
GT4 (2 h)	0,392 ± 0,023
Đối chứng dương	2,550 ± 0,038

Kiểm chứng dương tính giả

Trong thực tế, các protein có thể hấp phụ vật lý trực tiếp lên bề mặt Au mà không cần thông qua các liên kết hóa học. Như vậy đặt ra vấn đề là nếu quá trình gắn cysteamine và GAD không thực sự tạo thành các nhóm chức CHO trên Au, và nếu trong bước tiếp theo HRP được cố định lên bề mặt Au chỉ do hấp phụ vật lý, thì như vậy sự đổi màu của các lọ dung dịch cũng không chứng minh chắc chắn là đã tạo được các lớp cysteamine và GAD (hiện tượng dương tính giả). Để kiểm chứng vấn đề này, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm đối với 3 mẫu phiến Au không trải qua gắn cysteamine và GAD, mà được ngâm trực tiếp trong dung dịch HRP trong 16 h, sau đó cũng được ngâm vào lọ chứa ABTS và H₂O₂. Sau 24 giờ, các lọ đều không thấy chuyển màu, và được đo phổ UV-Vis. Kết quả cho thấy cường độ hấp thu trung bình tại đỉnh 420 nm của 3 lọ là 0,014 ± 0,009, cao hơn khoảng 3–4 lần so với các mẫu đối chứng âm trong các thí nghiệm ở các phần trước, nhưng thấp hơn nhiều so với các lọ có ngâm phiến Au trải qua các bước gắn cysteamine và GAD.

Từ đó có thể thấy trong thực tế dù không có cysteamine và GAD trên bề mặt Au thì HRP vẫn cố định lên, tuy nhiên sau khi ngâm HRP, các phiến được đem rửa sạch, HRP chỉ hấp phụ yếu lên Au và đã bị rửa trôi đi nhiều và phần còn lại không đáng kể. Còn khi bề mặt Au đã có cysteamine và GAD thì hầu hết HRP sẽ liên kết hóa học lên bề mặt, liên kết này bền chắc hơn và HRP không bị rửa trôi qua quá trình làm sạch, do

đó còn hiện diện rất nhiều trên Au và xúc tác mạnh cho phản ứng giữa ABTS và H₂O₂.

KẾT LUẬN

Để có thể chuyển cảm biến thành dao động với bề mặt có màng Au trở thành cảm biến có khả năng phát hiện các chất chỉ thị sinh học, thì cần thiết phải gắn kết thành công các kháng thể tương ứng lên bề mặt Au. Vì bản chất kháng thể là protein, nên nghiên cứu này tập trung theo hướng gắn kết cysteamine và GAD lên bề mặt Au. Kết quả đo đặc góc tiếp xúc của nước trên bề mặt Au sau mỗi lần biến đổi bề mặt cho thấy tính ái kỵ nước thay đổi rõ rệt. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cysteamine, thời gian ngâm cysteamine, thời gian ngâm GAD cho thấy các thông số này có ảnh hưởng quan trọng đến chất lượng 2 lớp cysteamine/GAD. Trong phạm vi các điều kiện đã tiến hành nghiên cứu, kết quả cho thấy nồng độ cysteamine 5 mM, thời gian ngâm cysteamine 16 h và thời gian ngâm GAD 1 h để tạo ra lớp cysteamine/GAD thích hợp nhất cho việc gắn kết các protein trên bề mặt Au. Kết quả có nhiều khả năng ứng dụng trong việc cố định kháng thể lên bề mặt Au để cảm biến mang tính đặc hiệu trong xét nghiệm.

Lời cảm ơn: Bài báo này là một phần công việc phục vụ đề tài C2014-32-01. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Phòng Thí Nghiệm Công nghệ Nano và Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Study on modifying the Au surface by thiol compound for biosensor application

- Phan Thanh Nhat Khoa
- Nguyen Trung Thanh
- Phan Van Tuan
- Pham Van Binh
- Pham Xuan Thanh Tung
- Le Thi Thanh Tuyen
- Tong Duy Hien

Laboratory for Nanotechnology, VNU-HCM

ABSTRACT

In cantilever-based biosensor, Au surface plays two essential roles: as a surface to reflect laser beam and as a surface to be modified and thus functionalize the sensor. In this paper, we researched on modifying the Au surface by cysteamine and glutaraldehyde to make it reactive toward amine substances. Cysteamine concentration, cysteamine treatment time and glutaraldehyde treatment time were investigated to

find optimal values. The data of chromogenic reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRP) and the data of water contact angle measurement were combined to find the optimal values. The results showed that the modification with 5 mM cysteamine in ethanol for 16 h and glutaraldehyde for 1 h would create the Au surface which can react optimally with amine substances.

Keywords: contact angle, cantilever, cysteamine, glutaraldehyde, horseradish peroxidase

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. O. Bui, G.P. Kennedy et.al, Structural analysis of silicon dioxide and silicon oxynitride films produced using an oxygen plasma, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 26, 6, 1700-1712 (1998).
- [2]. O. Bui, M. Gartner, S. Taylor, G.P. Kennedy, Structural analysis of silicon dioxide and silicon oxynitride films produced using an oxygen plasma, *Plasma Science, IEEE Transactions on*, 26, 6, 1700-1712 (1999).
- [3]. C. Jiménez, J. Perrie, I. Vickridge, J.P. Enard, J.M. Albella, Transformation of silicon nitride in oxygen plasma, *Surface and Coatings Technology*, 45,1-3, 15,147-154 (1991).
- [4]. S. Weichela, R. de Reusa, S. Bouaidata, P.A. Rasmussena, O. Hansena, K. Birkelundb, H. Dirac, Low-temperature anodic bonding to silicon nitride, *Sensors and Actuators A: Physical*, 82, 1-3, 15,249-253 (2000).
- [5]. D.S. Chen et al, Serum α -fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 86, 1404-1409 (1984).
- [6]. J.T. Wu, Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 20, 98-105 (1990).
- [7]. I.C. Weitz, H.A. Liebman, Des- γ -carboxy (abnormal)prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review, *Hepatology*, 18, 990-997 (1993).
- [8]. T. Behneand, M.S. Copur, Biomarkers for hepatocellular carcinoma, *International Journal of Hepatology*, 2012, 859076 (2012).

- [9]. M.S.S. Mízia et al, Gold electrode modified by self-assembled monolayers of thiols to determine DNA sequences hybridization, *Journal of Chemical Science*, 122, 911–917 (2010).
- [10]. B. Anja et al, Cantilever-like micromechanical sensors, *Reports on Progress in Physics*, 74, 036101 (2011).
- [11]. A. R. Digvijay et al, Quantitative and Label-Free technique for measuring protease activity and inhibition using a microfluidic cantilever array, *Nano Letters*, 8, 2968–2974 (2008).
- [12]. Z. Guo-Jun, N. Yong, Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: A review, *Analytica Chimica Acta*, 749, 1–15 (2012).
- [13]. T.C. Wen T, L.I. Chien, Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of alpha-fetoprotein, *Sensors and Actuators B*, 106, 455–460 (2005).
- [14]. K. Eung-Sam et al, Synergistic effect of orientation and lateral spacing of protein G on an on-chip immunoassay, *Analyst*, 137, 2421–2430 (2012).
- [15]. K.Y.W. April, J.K.Æ. Ulrich, Surface characterization of 3-glycidoxypyltrimethoxysilane films on silicon-based substrates, *Anal Bioanal Chem*, 383, 187–200 (2005).
- [16]. D. Jinpian et al, A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors, *Analytical Biochemistry*, 343, 322–328 (2005).
- [17]. N.R. Jose et al, Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle, *Journal of The American Chemical Society*, 123, 11838–11847 (2001).
- [18]. P. George, Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents, *The Journal of Biological Chemistry*, 201, 413–426 (1953).
- [19]. J. Everse, The structure of heme proteins compound I and II: some misconceptions, *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1338–1346 (1998).
- [20]. Z. Michael, High-resolution X-ray photoelectron spectroscopy in studies of self-assembled organic monolayers, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 178, 380–393 (2010).