

NGHIÊN CỨU KẾT HỢP HẠT NANO VÀNG VỚI APTAMER ĐẶC HIỆU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHẤT DẪN TRUYỀN THẦN KINH

Đến tòa soạn 06-05-2024

Trần Ngọc Bích¹, Phạm Thanh Hiền², Chu Thị Huệ¹, Nguyễn Thị Ánh Hoàng¹,
Phạm Thị Ngọc Mai¹, Phạm Gia Bách^{1*}

¹ Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email:phamgiabach@hus.edu.vn

SUMMARY

INVESTIGATING THE INTEGRATION OF GOLD NANOPARTICLES AND SPECIFIC APTAMERS FOR THE IDENTIFICATION OF NEUROTRANSMITTERS

The accurate detection and quantification of Dopamine and Serotonin, two crucial neurotransmitters, play an essential role in understanding and treating a range of mental and neurological disorders. This research focused on the development of a novel method for the precise and straightforward identification of Dopamine and Serotonin, by integrating specific aptamers with gold nanoparticles (AuNPs). With the optimal conditions that were investigated, the standard curve for determining Dopamine and Serotonin was constructed with a high correlation coefficient (> 0.99), and the limits of detection (LOD) for Dopamine and Serotonin were 1.7 nM and 1.4 nM, respectively. Simultaneously, the selectivity of the method was evaluated in the presence of various interfering substances. The results indicated a relatively high selectivity of the method when interfering substances were present. These findings not only provided a robust foundation for the development of rapid, accurate, and sensitive analytical methods for Dopamine and Serotonin but also opened up new research directions in the field of healthcare and pharmaceuticals.

Keywords: Dopamine, Serotonin, Aptamer, Gold nanoparticle.

1. MỞ ĐẦU

Chất dẫn truyền thần kinh là một loại hóa chất nội sinh trong não, có vai trò truyền tín hiệu từ các tế bào thần kinh đến các tế bào đích thuộc các bộ phận khác của cơ thể. Trong đó, dopamine và serotonin là một trong các chất dẫn truyền thần kinh phổ biến và quan trọng nhất đối với cơ thể. Trong khi, dopamine có liên quan đến bệnh Parkinson, một chứng rối loạn thoái hóa thần kinh ảnh hưởng đến chức năng vận động [1], Serotonin lại tham gia trực tiếp vào nhiệm vụ điều chỉnh đồng hồ sinh học, chu kỳ thức - ngủ của cơ thể. Cả Dopamine và Serotonin đều có vai trò quan trọng trong các bệnh thần kinh như Parkinson và Alzheimer [2].

Hiện nay, việc phân tích Dopamine và Serotonin thường yêu cầu các thiết bị phân tích hiện đại với

thời gian phân tích dài. Các kỹ thuật được sử dụng phổ biến như sắc ký lỏng (LC) [3], xét nghiệm miễn dịch enzym (ELISA) [4, 5] và khối phổ (MS) [6] yêu cầu đội ngũ kỹ thuật viên có tay nghề cũng như trang thiết bị, hóa chất và cơ sở vật chất hiện đại. Đây là rào cản đặc biệt lớn đối với việc điều trị bệnh nhân tại bệnh viện cấp cơ sở, tại nhà, hoặc tại những nơi hạn chế về nguồn nhân lực và cơ sở vật chất. Trong khi đó, cảm biến sinh học có thể khắc phục những nhược điểm của các phương pháp nêu trên một cách đơn giản, nhanh chóng, hiệu quả và có thể là công cụ cầm tay cho việc xác định nồng độ thuốc trong điều trị.

Một trong những vật liệu được ứng dụng chế tạo các cảm biến là các hạt nano vàng (AuNPs). Hạt nano vàng là một loại hạt nano có kích thước từ 1 đến 100 nanomet, được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như y tế, điện tử, và hóa học do các

đặc tính độc đáo của nó như khả năng hấp thụ và phản xạ ánh sáng [7]. Hạt nano vàng có thể được điều chế với nhiều hình dạng và kích thước khác nhau, cho phép nó có thể được tùy chỉnh để phù hợp với nhiều ứng dụng khác nhau. Tuy nhiên, một trong những điểm yếu của hạt nano vàng là độ chọn lọc chưa cao, nhiều chất phân tích có thể tương tác với hạt nano vàng [8].

Để tăng độ chọn lọc, AuNPs thường được kết hợp với nhiều các phối tử đặc hiệu khác nhau như các phối tử hữu cơ, các kháng thể đặc hiệu, hay aptamer [9,10]. Trong đó, các aptamer đặc hiệu đã bắt đầu được nghiên cứu kết hợp với hạt nano trong các cảm biến sinh học hiệu quả. Aptamer là một loại oligonucleotide có khả năng gắn kết với một mục tiêu cụ thể với độ chính xác cao. Khi kết hợp với hạt nano vàng, aptamer có thể được sử dụng để phát hiện chọn lọc nhiều chất phân tích khác nhau. Hạt nano vàng hoạt động như một dẫn truyền tín hiệu, còn aptamer hoạt động như một “khóa” cho “ổ khóa” của chất phân tích. Khi chất phân tích gắn kết với aptamer, nó thay đổi cấu trúc của aptamer, dẫn đến sự thay đổi trong tín hiệu của hạt nano vàng [11,12]. Điều này cho phép phát hiện và định lượng chính xác nồng độ của chất phân tích trong một mẫu. Hệ thống này không chỉ đơn giản và nhanh chóng, mà còn có độ nhạy và độ chính xác cao [13,14].

Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu và phát triển một cảm biến sinh học mới, dựa trên sự kết hợp giữa hạt nano vàng và aptamer đặc hiệu. Phương pháp này cho phép xác định một cách chính xác và hiệu quả hai chất dẫn truyền thần kinh quan trọng, Dopamine và Serotonin. Kết quả của nghiên cứu này mở ra những triển vọng mới trong việc phát hiện và điều trị các bệnh liên quan đến chất dẫn truyền thần kinh, đồng thời cung cấp một công cụ mới và hiệu quả cho việc nghiên cứu phát triển các phương pháp phân tích sinh học tiên tiến hơn, giúp cải thiện chất lượng chăm sóc sức khỏe và cuộc sống của con người.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất tinh khiết phân tích: HAuCl_4 , natri clorua (NaCl), natri hydroxit (NaOH), acid citric ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), natri citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), dopamin, serotonin (Sigma), aptamer, aptamer-comp (Phusa Biochem LTD),

Máy quang phổ UV-Vis 1601 PC – Shimadzu (Nhật Bản), bước sóng làm việc từ 400-800 nm, cuvet nhựa chiều dày $l = 1\text{ cm}$.

2.2. Điều chế dung dịch AuNPs

Dung dịch nano Au được điều chế dựa theo phương pháp Turkevich sử dụng natri citrat làm chất khử để khử HAuCl_4 xuống Au^0 đồng thời các ion citrat hấp phụ trên bề mặt hạt Au cũng có tác dụng bảo vệ và làm ổn định hạt Au [15].

2.3. Quy trình đo Dopamine và Serotonin

Thêm chất dẫn truyền thần kinh (Dopamine, Serotonin) vào dung dịch chứa aptamer đặc hiệu nồng độ 10^{-5} M , đệm Na_2HPO_4 10mM pH = 7,5 và MgCl_2 2 mM. Dung dịch được ủ trong 2,5 giờ tại nhiệt độ phòng trước khi thêm 50 μL aptamer-comp (đoạn ADN liên hợp bổ sung với aptamer tạo thành ADN sợi đôi) 10^{-5} M và tiếp tục ủ trong 30 phút. Sau đó, thêm 1 mL dung dịch nano vàng 10 nM và 1mL đệm Na_2HPO_4 10 mM pH = 7,5 và tiếp tục ủ trong 40 phút. Sau khi kết thúc quá trình ủ, thêm từ từ dung dịch muối vào trước khi tiến hành đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở 2 bước sóng 530 và 650 nm.

2.4. Xử lý và phân tích mẫu

Thêm 1mL acetonitril vào 1 mL mẫu huyết tương trắng, trộn đều rồi ly tâm 5 phút với tốc độ 10000 vòng/phút. Hút 300 μL dung dịch sau khi ly tâm vào các ống 2 mL và thêm nước để định mức đến vạch 0,5 mL. Chiết dung dịch thu được bằng 1mL dung dịch dichloromethane, lắc trong vòng 15 phút. Sau đó ly tâm tách lớp trong 5 phút với tốc độ 10000 vòng/phút, lấy dung dịch dichloromethane phía dưới.

Tiến hành đo các mẫu theo quy trình trong mục 2.3. Hàm lượng Dopamine và Serotonin được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

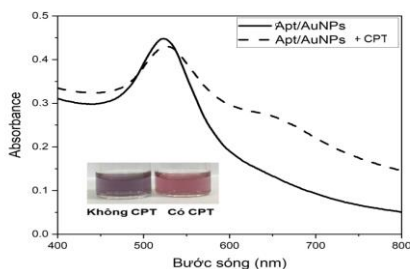
3.1. Nguyên tắc xác định Dopamine và Serotonin

Các aptamer đặc hiệu cho Dopamine hoặc Serotonin, đã được chọn lọc các nghiên cứu trước đây, được lựa chọn để kết hợp với hạt nano Au trong nghiên cứu này.

Khi không có mặt chất phân tích, các aptamer sẽ dễ dàng liên kết với đoạn ADN bổ sung của nó, tạo thành một đoạn ADN sợi đôi. Các phân tử ADN sợi đôi này sẽ không có khả năng bám lên bề mặt AuNPs để giúp ổn định hạt AuNPs trong môi trường muối cao. Vì vậy, tại nồng độ muối cao, các hạt AuNPs bị kết tụ, làm dung dịch chuyển từ màu đỏ (AuNPs tự do) sang màu tím (AuNPs kết tụ) (Hình 1).

Mặt khác, khi có mặt chất phân tích, các aptamer sẽ liên kết chặt với chất phân tích, ức chế quá trình tạo ra ADN sợi đôi. Các aptamer tự do trong dung

dịch dễ dàng bị hấp phụ trên bề mặt nano vàng và làm ổn định các hạt AuNPs tại nồng độ muối cao (Hình 1) giữ cho dung dịch có màu đỏ (AuNPs tự do). Sự thay đổi màu sắc của dung dịch khi có chất phân tích và không có chất phân tích có thể quan sát được bằng mắt thường hoặc định lượng bằng máy đo quang phổ UV-Vis dựa -NH₂ trên tỷ lệ độ hấp thụ quang tại 2 bước sóng 530 và 650 nm (Hình 1).



Hình 1. Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của phức hợp Apt/AuNPs khi có và không có mặt chất phân tích (CPT)

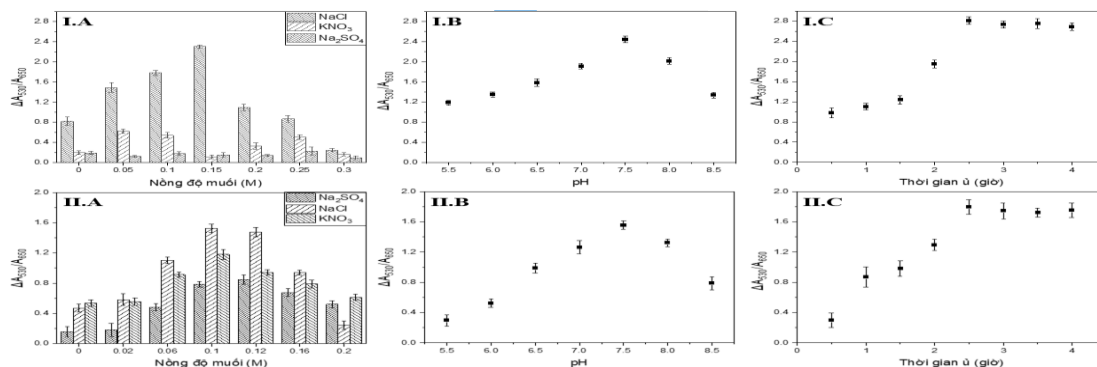
3.2. Tối ưu các điều kiện xác định Dopamine và Serotonin Quy trình xác định Dopamine và Serotonin được tối ưu với các điều kiện đo như nồng độ muối điện ly, pH và thời gian ủ. Dung dịch muối điện ly đóng vai trò rất quan trọng trong việc tạo nên sự kết tụ của hệ nano AuNPs/Aptamer. Trong số các muối điện ly khảo sát bao gồm NaCl, KBr,

KNO₃ tại các nồng độ khác nhau, dung dịch NaCl 0,15 M với Dopamine (Hình 2.I.A) và 0,1 M với Serotonin (Hình 2.II.A) cho tỷ lệ độ hấp thụ quang ở 2 bước sóng 530 và 650 nm lớn nhất.

Do trong phân tử Dopamine và Serotonin đều chứa nhóm chức -NH₂ và -OH, pH đóng vai trò quyết định điện tích của chất phân tích cũng như tương tác tĩnh điện giữa các chất phân tích và bề mặt mang điện tích âm của hạt AuNPs-citrate. Kết quả khảo sát ở Hình 2.I.B và 2.II.B cho thấy, khi thay đổi pH trong khoảng từ 5 đến 8, tín hiệu đo đạt giá trị cực đại tại pH = 7,5; là giá trị tại đó bắt đầu có sự phân li proton của nhóm -OH làm giảm điện tích dương của Dopamine, Serotonin và giảm tương tác với bề mặt AuNPs tích điện âm.

Cuối cùng, thời gian ủ tối ưu giữa aptamer và chất phân tích cũng đã được khảo sát trong khoảng từ 0 đến 3 giờ để đảm bảo các chất phân tích được liên kết chặt chẽ và ổn định với aptamer. Hình 2.I.C và 2.II.C ta thấy 2,5 giờ là thời gian tối ưu, cho tín hiệu tỷ lệ độ hấp thụ quang đạt cực đại và bão hòa, tương ứng với thời gian các Dopamine và Serotonin có thể gắn đặc hiệu vào các aptamer.

Như vậy, các điều kiện tối ưu để xác định Dopamine và Serotonin được lựa chọn như sau: dung dịch muối điện ly: NaCl 0,15 M với Dopamine và NaCl 0,1 M với Serotonin; pH 7,5; thời gian ủ dung dịch aptamer với chất phân tích: 2,5 giờ.

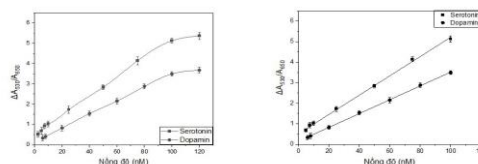


Hình 2. Tối ưu hóa các điều kiện phân tích I) Dopamine; II) Serotonin: A) Ảnh hưởng của loại muối và nồng độ muối; B) Ảnh hưởng của pH; C) Ảnh hưởng của thời gian ủ

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Dopamine và Serotonin

Tỷ lệ độ hấp thụ quang ở 2 bước sóng 530 và 650 nm của Dopamine có nồng độ thay đổi trong khoảng từ 6 nM đến 120 nM và Serotonin có nồng độ thay đổi trong khoảng từ 5 nM đến 120 nM tại các điều kiện đo tối ưu được biểu diễn trong Hình 3A. Từ kết quả trong hình 3A có thể thấy tỷ lệ độ hấp thụ quang tăng tuyến tính với nồng độ Dopamine,

Serotonin và đây sẽ là cơ sở để định lượng Dopamine và Serotonin bằng phương pháp này.



Hình 3. A) Ảnh hưởng của nồng độ Dopamine và Serotonin; B) Đường chuẩn của Dopamine và Serotonin

3.4. Đánh giá phương pháp xác định Dopamine và Serotonin

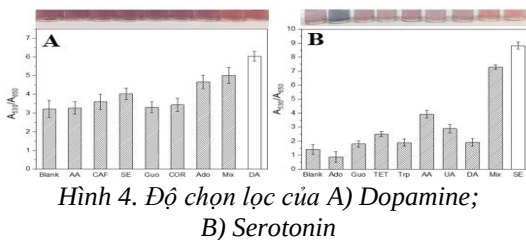
Phương pháp phân tích Dopamine và Serotonin tiếp tục được đánh giá thông qua việc xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chụm và độ đúng của phương pháp.

Xây dựng đường chuẩn của Dopamine với nồng độ Dopamine trong khoảng từ 6 nM đến 100 nM và đường chuẩn của Serotonin với nồng độ trong khoảng từ 5 nM đến 100 nM; sử dụng tín hiệu đo là tỉ lệ độ hấp thụ quang ở 2 bước sóng 530 và 650 nm (A530/650) tại các điều kiện tối ưu. Kết quả thu được nồng độ Dopamine và Serotonin có quan hệ tuyến tính với A530/650 với hệ số tương quan R² đều lớn hơn 0,995 (Hình 3B), phù hợp để ứng dụng phân tích trong thực tế.

Độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại: Đo lặp 7 lần dung dịch Dopamine và Serotonin ở các nồng độ 10 nM, 30 nM và 50 nM. Kết quả thu được với các mức nồng độ trên cho giá trị độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) là 4,54%; 4,68%; 1,49% đối với Dopamine và 3,96%; 4,87%; 2,95% đối với Serotonin đáp ứng yêu cầu của Hiệp hội các nhà phân tích (AOAC) [16].

LOD và LOQ được xác định từ đường chuẩn, theo công thức $LOD = 3Sy/b$ và $LOQ = 10Sy/b$. Kết quả thu được giá trị LOD là 1,7 nM; LOQ là 5,6 nM đối với Dopamine và LOD là 1,4 nM; LOQ là 4,6 nM đối với Serotonin. Giá trị LOD thu được của phương pháp thấp hơn nhiều so với một số phương pháp sử dụng aptamer trước đây [13,14].

3.5. Khảo sát tính chọn lọc của phương pháp



Hình 4. Độ chọn lọc của A) Dopamine; B) Serotonin

Một trong những thông số phân tích quan trọng của cảm biến là tính chọn lọc. Để đánh giá độ chọn lọc của phương pháp xác định Dopamine, tiến hành phân tích dung dịch Apt-AuNPs với sự có mặt của một số chất ảnh hưởng thường gặp trong mẫu sinh học như Serotonin (SE), Caffeine (CAF), Acid Ascorbic (AA), Guanosine (Guo), Cordycepin (COR), Adenosine (Ade) ở cùng một nồng độ 50 nM và một mẫu không có chất chuẩn. Kết quả thấy được khi có mặt các chất ảnh hưởng và không có chất chuẩn Dopamine thì các dung dịch chuyển sang màu tím, còn dung dịch chứa

Dopamine thì dung dịch màu đỏ (Hình 4A). Như vậy, phương pháp có độ chọn lọc cao khi xác định Dopamine.

Tương tự, đánh giá độ chọn lọc của phương pháp khi phân tích Serotonin với sự có mặt của chất ảnh hưởng là Tryptophan (Trp), Tetacycline (TET), Acid Ascorbic (AA), Guanosine (Guo), Adenosine (Ado), Uric acid (UA), Dopamine (DA) ở cùng một nồng độ 50 nM và một mẫu không có chất chuẩn Serotonin (Hình 4B). Trong đó, Tryptophan là tiền chất chuyển hóa của Serotonin trong cơ thể. Kết quả cho thấy các chất này không gây ảnh hưởng đến kết quả đo và phương pháp có độ chọn lọc cao đối với Serotonin. Như vậy, phương pháp này hoàn toàn có thể được sử dụng để xác định Serotonin trong mẫu sinh học.

3.6. Kết quả phân tích Dopamine và Serotonin trong mẫu

Phương pháp trên tiếp tục được áp dụng để xác định nồng độ Dopamine và Serotonin trong mẫu huyết tương trắng được thêm chuẩn. Kết quả phân tích trong Bảng 1 có thể thấy, nồng độ của Dopamine và Serotonin có trong các nền mẫu huyết tương thêm chất chuẩn có hiệu suất thu hồi từ 90,2% đến 106,9%. Như vậy, quy trình xác định Dopamine và Serotonin bằng hạt nano vàng kết hợp aptamer đã được tối ưu tốt, phù hợp với việc phân tích các mẫu thực tế với nền mẫu phức tạp.

Bảng 1. Kết quả phân tích Dopamine và Serotonin trong một số nền mẫu huyết tương

	Mẫu	C thêm vào (nM)	C đo được (nM)	Hiệu suất thu hồi (%)
Dopamine	1	4,90	4,48	91,4
	2	9,80	8,84	90,2
	3	29,6	30,1	101,7
Serotonin	1	37,5	40,1	106,9
	2	50,0	47,7	95,4
	3	60,2	58,2	96,6

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu thành công việc kết hợp Aptamer với AuNPs để phát hiện Dopamine và Serotonin trong mẫu sinh học bằng phương pháp phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về kết hợp và ứng dụng Aptamer/AuNPs trong phân tích nhằm tăng độ nhạy và độ chọn lọc của phương pháp. Phương pháp có độ chính xác cao và giới hạn phát hiện của Dopamine và Serotonin lần lượt là 1,7 nM và 1,4 nM, thấp hơn đáng kể so với các phương pháp

hiện nay đang sử dụng. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và đã được áp dụng để xác định Dopamine và Serotonin trong mẫu huyết tương với hiệu suất thu hồi từ 90,2 % đến 106,9 %. Nghiên cứu có thể mở rộng ra để phát triển thiết bị cầm tay theo dõi nồng độ các chất phân tích trong các đối tượng sinh học như nước tiểu và huyết tương.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.23.07 của ĐHQGHN.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của nhóm nghiên cứu và chưa gửi đăng nội dung này ở bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chowdhury, R., Guitart-Masip, M., Bunzeck, N., Dolan R.J., Düzel, E., (2012). Dopamine modulates episodic memory persistence in old age. *J Neurosci*, **32(41)**, 14193-14204.
- [2] Buchanan, A. M., Mena, S., Choukari, I., Vasa, A., Crawford, J. N., Fadel, J., (2024). Serotonin as a biomarker of toxin-induced Parkinsonism. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **30(1)**, 33.
- [3] Zhao, X.E, Suo, Y.R., (2008). Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. *Talanta*, **76(3)**, 690-697.
- [4] Thomas, A., Geyer, H., Mester, H.J, (2006). Quantitative determination of adrenaline and noradrenaline in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **64**, 587-591.
- [5] Powell, P.R., A.G. Ewing., (2005). Recent advances in the application of capillary electrophoresis to neuroscience. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, **382**, 581-591.
- [6] Carrera, V., Sabater, E., Vilanova, E., Sogorb, M.A., (2007). A simple and rapid HPLC–MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. *Journal of Chromatography B*, **847(2)**, 88-94.
- [7] Saha, K., Agasti, S.S., Kim, C., Li, X., Rotello, V.M., (2012). Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, **112(5)**, 2739-2779.
- [8] Kusuma, S.A.F., Harmonis, J.A., Pratiwi, R., Hasanah, A.N., (2023). Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Sensors: Properties and Application in Detection of Heavy Metals and Biological Molecules. *Sensor*, **23(19)**, 8172.
- [9] Kulabhusan, P.K., Hussain, B., Yüce, M., (2020). Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. *Pharmaceutics*, **12(7)**, 646.
- [10] Nooranian, S., Mohammadinejad, A., Mohajeri, T., Aleyaghoob, G., (2022). Biosensors based on aptamer-conjugated gold nanoparticles: a review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **69(4)**, 1517-1534.
- [11] Zhang, F., Liu, J., (2021). Label- free colorimetric biosensors based on aptamers and gold nanoparticles: a critical review. *Analysis & Sensing*, **1(1)**, 30-43.
- [12] Hu, S., Huang, P-J.J., Wang, J., Liu, J., (2020). Dissecting the effect of salt for more sensitive label-free colorimetric detection of DNA using gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, **92(19)**, 13354-13360.
- [13] Liu, X., Zhou, Z., Zhang, L., Tan, Z., Shen, G., Yu, R., (2009). Colorimetric sensing of adenosine based on aptamer binding inducing gold nanoparticle aggregation. *Chinese Journal of Chemistry*, **27(10)**, 1855-1859.
- [14] Chávez, J.L., Hagen, J.A., (2017). Fast and Selective Plasmonic Serotonin Detection with Aptamer-Gold Nanoparticle Conjugates. *Sensors*, **17(4)**, 681.
- [15] Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Quang Khánh, Phạm Thị Ngọc Mai, (2019). Synthesis of nano gold particles towards application as sensor for acetamiprid determination. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **24**, 163-167.
- [16] AOAC, (2012). Appendix F, Guidelines for standard method performance requirements. *AOAC official methods of Analysis*, **9**.