

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

\*\*\*\*\*

**ĐÀO MINH ĐỨC**

**NGHIÊN CỨU TẠO BIOSENSOR XÁC ĐỊNH KHÁNG  
NGUYÊN HER2**

**LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC**

Hà Nội - 2014

## LỜI CẢM ƠN

*Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Quang Huấn đã tạo điều kiện cũng như tận tình chỉ bảo và động viên trong suốt thời gian thực hiện luận văn tốt nghiệp.*

*Em xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ hết sức quý báu cả về kiến thức lẫn tinh thần từ tập thể phòng Công nghệ tế bào động vật, Trung tâm giám định ADN, Viện Công nghệ sinh học.*

*Nhân dịp này em cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy, cô, bạn bè và gia đình đã chỉ dẫn và giúp đỡ em trong suốt thời gian qua.*

*Hà Nội, ngày tháng năm 2014*

*Học viên*

**Đào Minh Đức**

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
MỤC LỤC .....	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
MỞ ĐẦU .....	- 1 -
CHƯƠNG I TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	- 3 -
1. 1. UNG THƯ VÍ BIỂU HIỆN HER2 .....	- 3 -
1.1.1. Ung thư vú .....	- 3 -
1.1.2. HER2.....	- 3 -
1.1.2.1. <i>Xác định sự biểu hiện HER2 ở mức ADN.....</i>	- 5 -
1.1.2.2. <i>Xác định sự biểu hiện HER2 ở mức ARN .....</i>	- 7 -
1.1.2.3. <i>Xác định sự biểu hiện HER2 ở mức protein .....</i>	- 7 -
1.2. BIOSENSOR.....	- 9 -
1.2.1. Giới thiệu chung về Biosensor .....	- 9 -
1.2.2. Lịch sử phát triển của Biosensor .....	- 10 -
1.2.3. Đặc điểm – Yêu cầu của Biosensor.....	- 11 -
1.2.4. Nguyên lý hoạt động chung của Biosensor .....	- 12 -
1.2.5. Ứng dụng của Biosensor.....	- 13 -
1.3. TỔNG QUAN VỀ APTAMER .....	- 15 -
1.3.1. Khái niệm.....	- 15 -
1.3.2. Lịch sử.....	- 15 -
1.3.3. Đặc trưng của Aptamer.....	- 16 -
1.3.4. Ưu điểm của Aptamer so với kháng thể. ....	- 17 -

1.3.5. Phương pháp thu nhận Aptamer – Phương pháp SELEX ( <i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i> ) .....	18 -
<b>CHƯƠNG II VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>23 -</b>
<b>2. 1. VẬT LIỆU .....</b>	<b>23 -</b>
2.1.1. Sinh phẩm.....	23 -
2.1.2. Hóa chất.....	23 -
2.1.3. Trang thiết bị.....	25 -
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>25 -</b>
2.2.1. Sàng lọc Aptamer đặc hiệu HER2 (Phương pháp SELEX).....	25 -
2.2.1.1. Chuẩn bị thư viện .....	25 -
2.2.1.2. Sàng lọc .....	27 -
2.2.1.3. Phương pháp tách dòng và giải trình tự .....	29 -
2.2.1.3.1. Nhân bản Aptamer đặc hiệu với HER2 bằng phương pháp PCR.....	29 -
2.2.1.3.2. Phân tích điện di trên gel agarose.....	31 -
2.2.1.3.3. Phương pháp tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR.....	32 -
2.2.1.3.4. Phản ứng gắn gen vào vector tách dòng .....	33 -
2.2.1.3.5. Biến nạp plasmid vào E.coli chủng DH5a.....	34 -
2.2.1.3.6. Phương pháp tách ADN plasmid từ vi khuẩn E. coli.....	35 -
2.2.1.3.7. Phương pháp xác định trình tự nucleotide .....	36 -
2.2.1.4. Phương pháp gắn Aptamer lên hạt nano vàng. ....	37 -
2.2.2. Phương pháp gắn Aptamer lên bề mặt điện cực.....	37 -
2.2.2.1. Xử lý và làm sạch điện cực Au .....	38 -
2.2.2.2. Tạo lớp MPA trên bề mặt điện cực vàng .....	38 -
2.2.2.3. Gắn NHS lên bề mặt điện cực đã xử lý với MPA.....	39 -
2.2.2.4. Gắn NH <sub>2</sub> -Aptamer lên điện cực Au/MPA-NHS .....	39 -
2.2.2.5. Định lượng HER2 trong mẫu bằng điện cực Au/MPA-NHS .....	39 -
2.2.2.6. Tái sử dụng điện cực Au/MPA-NHS .....	39 -
2.2.2.7. Đánh giá hoạt động của Aptasensor .....	40 -
2.2.3. Phương pháp lai Dot blot .....	40 -

<b>CHƯƠNG III KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>3.1. SÀNG LỌC APTAMER ĐẶC HIỆU HER2 .....</b>	<b>- 41 -</b>
3.1.1. Kết quả thu nhận và xác định trình tự Aptamer .....	- 41 -
3.1.2. Kết quả xác định cấu trúc không gian của Aptamer .....	- 43 -
3.1.3. Xác định kết quả tạo phức hệ Aptamer-hạt nano vàng .....	- 46 -
3.1.4. Xác định gắn kết của Aptamer trên tế bào BT474 và tế bào MCF7 .....	- 48 -
3.1.5. Xác định sự gắn kết của Aptamer với HER2 bằng kỹ thuật Dot blot .....	- 50 -
<b>3.2. CHẾ TẠO BIOSENSOR ĐIỆN HÓA.....</b>	<b>- 52 -</b>
3.2.1. Làm sạch và hoạt hóa điện cực.....	- 52 -
3.2.2. Tạo đơn lớp mỏng trên bề mặt điện cực vàng.....	- 52 -
3.2.3. Gắn Aptamer lên điện cực đã tạo lớp màng mỏng trên bề mặt .....	- 54 -
3.2.4. Phong tỏa các vị trí gắn kết không đặc hiệu trên bề mặt điện cực.....	- 55 -
3.2.5. Định lượng kháng nguyên HER2 trong các mẫu phân tích.....	- 59 -
<b>CHƯƠNG IV KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>- 64 -</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Apt	Aptamer
Bp	Cặp base
BSA	Bovine Serum Albumin
ADN	Axit deoxyribonucleic
EDTA	Axit ethyenediaminetetraacetic
<i>E.coli</i>	Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>
SELEX	Systematic Evolution of LigADNs by EXponential enrichment
NST	Nhiễm sắc thể
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
Kb	Kilo base
LB	Môi trường LB
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp
RT – PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp thời gian thực
ARN	Axit Ribonucleic
mARN	ARN thông tin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF	Polyvilidene Fluoride
ssADN	Sợi đơn ADN
SDS	Natri dodexyl sulphat
TAE	Tris – acetate – EDTA
<i>Taq polymerase</i>	Enzyme <i>polymerase</i> chịu nhiệt
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphat
HER	Human epidermal growth factor receptor
WHO	Tổ chức y tế thế giới

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
FISH	Fluorescence in situ hybridization
CISH	Chromogenic In Situ Hybridization
SISH	Silver In Situ Hybridization
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol.2 HCl 1
IHC	Immunohistochemocal technique
DAB	3,3'-diaminobenzidine chromogen
TE	Tris – EDTA
MPA	3-Mercaptopropionic acid
MES	2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid
NHS	N-hydroxy-succinimide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
KOH	potassium hydroxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
NaBH <sub>4</sub>	sodium borohydride
Au	Vàng
CV	Cyclic voltammetry
SWV	Square wave voltammetry
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
SB	Selex Buffer

## DANH MỤC CÁC HÌNH

<b>Hình 1.1.</b> Khảo sát mức độ khuếch đại của gen <i>HER2</i> trên NST 17 của tế bào mô vú bằng phương pháp FISH	13
<b>Hình 1.2.</b> Khảo sát sự biểu hiện của thụ thể <i>HER2</i> bằng phương pháp IHC. Mức độ biểu hiện của thụ thể <i>HER2</i> được đánh giá theo phương pháp DAKO	16
<b>Hình 1.3.</b> Sơ đồ cấu tạo của Biosensor	18
<b>Hình 1.4.</b> Các thành phần của yếu tố nhận biết sinh học và các dạng Biosensor	20
<b>Hình 1.5.</b> Nguyên lý hoạt động chung của một Biosensor	21
<b>Hình 1.6:</b> Quy trình Phương pháp Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX).	27
<b>Hình 1.7.</b> Sơ đồ Aptamer ssADN	28
<b>Hình 2.1.</b> Quy trình tách dòng và giải trình tự của những oligonucleotide gắn đặc hiệu <i>HER2</i>	37
<b>Hình 2.2.</b> Sơ đồ cấu tạo vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen)	41
<b>Hình 2.3.</b> Sơ đồ tạo lớp mỏng trên điện cực để gắn Aptamer	46
<b>Hình 3.1.</b> Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR tạo thư viện thứ cấp	50
<b>Hình 3.2.</b> Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR sau khi khuếch đại ở vòng sàng lọc thứ 12 và sau vòng sàng lọc loại trừ	52
<b>Hình 3.3.</b> Cấu hình không gian của Aptamer-1 đặc hiệu <i>HER2</i>	53
<b>Hình 3.4.</b> Cấu hình không gian của Aptamer-2 đặc hiệu <i>HER2</i>	54
<b>Hình 3.5.</b> Phổ hấp thụ của Aptamer và phức hệ Aptamer hạt nano vàng	55
<b>Hình 3.6.</b> Phổ hấp thụ UV-Vis của phức hệ Aptamer-hạt nano vàng	56
<b>Hình 3.7.</b> Kết quả xác định ái lực của phức hệ Apt-Au đối với tế bào BT474 và tế bào MCF7	58
<b>Hình 3.8.</b> Kết quả Dot Blot giữa mẫu hạt vàng có gắn Aptamer và hạt vàng không gắn Aptamer.	60
<b>Hình 3.9.</b> Kết quả Dot Blot tính đặc hiệu của Aptamer với <i>HER2</i>	60
<b>Hình 3.10.</b> Thế vòng ( <i>CV-cyclic voltammetry</i> ) của điện cực Au trong dung dịch $H_2SO_4$ , nồng độ 0,5M	61
<b>Hình 3.11.</b> Thế vòng (CV) và sóng vuông (SWV) của điện cực Au và Au-MPA ở các thời gian ủ khác nhau	62
<b>Hình 3.12.</b> Thế vòng (CV) và sóng vuông (SWV) của điện cực Au và Au-MPA-Apt ở các nồng độ khác nhau	63
<b>Hình 3.13.</b> Thế vòng ( <i>CV- cyclic voltammetry</i> ) và sóng vuông ( <i>square wave voltammetry - SWV</i> ) của điện cực Au và Au-MPA-Apt-BSA	65
<b>Hình 3.14.</b> Thế vòng (CV) của điện cực Au tại các bước sửa đổi	66
<b>Hình 3.15.</b> Đồ thị liên quan giữa thế và dòng đôi với các điện cực có bề mặt biến đổi khác nhau khi xác định theo kỹ thuật quét sóng vuông (SWV) của điện cực vàng tại các bước biến đổi	67
<b>Hình 3.16.</b> Thế vòng (CV) và sóng vuông (SWV) của điện cực Au và Au-MPA-Apt-BSA ở với các nồng độ kháng nguyên <i>HER2</i> khác nhau	69



## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 1.1.</b> So sánh ưu điểm của Aptamer và kháng thể	26
<b>Bảng 2.1.</b> Thành phần phản ứng PCR làm giàu thư viện	34
<b>Bảng 2.2.</b> Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR làm giàu thư viện	34
<b>Bảng 2.3.</b> Thành phần phản ứng tạo sợi đơn ADN	35
<b>Bảng 2.4.</b> Thành phần phản ứng PCR khuếch đại các trình tự gắn	38
<b>Bảng 2.5.</b> Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại các trình tự gắn	39
<b>Bảng 2.6.</b> Nồng độ gel sử dụng với kích thước ADN tương ứng	41
<b>Bảng 2.7.</b> Thành phần phản ứng gắn đoạn gen vào vector PCR2.1	42
<b>Bảng 3.1.</b> Kết quả đo nồng độ ADN sau sàng lọc ở bước 1	50
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả đo nồng độ (ng/ $\mu$ L) ADN sau các vòng sàng lọc	51
<b>Bảng 3.3.</b> Kết quả xác định phổ UV-Vis của phức hệ Aptamer-hạt nano vàng	55
<b>Bảng 3.4.</b> Phổ hấp thụ của hạt nano vàng và phức hệ hạt nano vàng-Aptamer	56
<b>Bảng 3.5.</b> Kết quả đo dòng ( $\mu$ A) của điện cực sau khi xử lý MPA	62
<b>Bảng 3.6.</b> Kết quả xác định dòng đối điện cực vàng sau các bước xử lý	63
<b>Bảng 3.7.</b> Kết quả xác định dòng đối với điện cực vàng bước xử lý BSA	64
<b>Bảng 3.8.</b> Kết quả xác định thế và dòng của điện cực sau các bước biến đổi	66
<b>Bảng 3.9.</b> Kết quả xác định thế và dòng của điện cực ủ với dung dịch HER2	68

## MỞ ĐẦU

Ung thư vú là bệnh hiểm nghèo thường gặp ở phụ nữ, chiếm gần 30% số trường hợp mắc bệnh ung thư mới mỗi năm, tỷ lệ mắc bệnh trung bình hàng năm xấp xỉ 1.1 triệu ca và 410,000 trường hợp tử vong vì bệnh ung thư này. Theo thống kê của tổ chức y tế thế giới (WHO), hiện nay Mỹ là nước có tỷ lệ mắc ung thư vú cao nhất thế giới, trung bình cứ 8 phụ nữ thì có 1 người mắc bệnh ung thư vú. Các nước châu Âu có tỷ lệ mắc ung thư vú thấp hơn Mỹ, trung bình khoảng 67,48/100.000 mỗi năm. Ở châu Á và một số nước đang phát triển, tỷ lệ mắc ung thư vú thấp hơn tại Mỹ và châu Âu nhưng đang có xu hướng tăng nhanh, trung bình khoảng 40,5/100.000 dân mỗi năm (Farooq, 2005).

Trong 15 năm qua tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú đã vượt qua ung thư cổ tử cung và sẽ tiếp tục tăng cao trong những năm tới. Hiện nay, Hà Nội và TP Hồ Chí Minh là hai nơi có tỷ lệ phụ nữ mắc ung thư vú cao nhất. Trong 100.000 phụ nữ ở Hà Nội thì có 30 phụ nữ mắc ung thư vú mỗi năm, ở TP Hồ Chí Minh thì tỷ lệ này là 20/100.000 (Nguyễn Chấn Hùng, 2010).

Một trong những chỉ thị ung thư vú được quan tâm là thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô 2 (Human epithelial growth factor receptor 2 hay HER2). Tế bào vú bình thường chỉ có 2 bản sao gen *HER2* nhưng ở tế bào ung thư vú dương tính HER2, gen *HER2* được khuếch đại thành nhiều bản sao dẫn đến hiện tượng HER2 biểu hiện trên bề mặt tế bào vú gấp 50-100 lần so với bình thường (siêu biểu hiện) (Venter, 1987). Bệnh nhân ung thư vú dương tính HER2 thường có tiên lượng xấu và chỉ sống sót được vài năm sau khi mắc bệnh.

Như vậy, việc xác định sớm hàm lượng HER2 trong cơ thể có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và điều trị ung thư vú. Hiện có nhiều phương pháp xác định mức độ biểu hiện quá mức của HER2. Tuy nhiên, mỗi phương pháp đã nêu đều có những ưu điểm và hạn chế nhất định. Do vậy, việc tìm kiếm phương pháp mới để có thể xác định