

Xây dựng aptasensor điện hóa sử dụng aptamer đặc hiệu phát hiện kháng sinh neomycin trong sữa

Nguyễn Trường Giang^{1,2*}, Lê Quang Huân²

¹Công ty phát triển công nghệ ứng dụng Việt Nam - VNDAT, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Sữa và các sản phẩm từ sữa, thường được coi là thực phẩm tự nhiên cân bằng sức khỏe và cân bằng dinh dưỡng, bao gồm các chất dinh dưỡng thiết yếu cho mọi lứa tuổi và là một phần quan trọng trong chế độ ăn uống hàng ngày của chúng ta. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh bừa bãi, quá liều lượng cho phép, không đúng mục đích sử dụng khiến thực phẩm và các sản phẩm từ động vật nói chung và từ sữa nói riêng có nguy cơ gây hại tới sức khỏe của con người. Những người tiêu dùng nhạy cảm có thể bị dị ứng hoặc thậm chí gặp những vấn đề nghiêm trọng hơn về sức khỏe. Kháng sinh tồn dư trong một thời gian dài sẽ dẫn đến tình trạng kháng kháng sinh khiến con người khó kiểm soát bệnh tật và gây ra nhiều hệ lụy trong tương lai. Có rất nhiều phương pháp hiện đại được đưa ra nhằm phát hiện kháng sinh trong thực phẩm. Một trong số đó là phương pháp điện hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng aptamer Neo6 và chip nano vàng nhằm chế tạo aptasensor điện hóa có khả năng xác định dư lượng neomycin trong sữa với khoảng tuyến tính là 10 - 3.000 ng/mL cũng như xác định được độ nhạy và độ đặc hiệu của aptasensor khá cao. Bên cạnh đó, chúng tôi đã bước đầu so sánh trên 20 mẫu sữa bổ sung kháng sinh cho thấy kết quả tương đồng với kết quả phân tích được bằng phương pháp LC-MS/MS.

Từ khóa: aptamer Neo6, điện hóa, neomycin, điện cực vàng, aptasensor.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Neomycin là một aminoglycosid polycationic được sản xuất bởi actinomycetes được phân lập lần đầu tiên vào năm 1949 từ vi khuẩn *Streptomyces fradiae* ở đất do Waksman và Lechevalier [1]. Neomycin ức chế tổng hợp protein bằng cách liên kết với tiểu đơn vị 30s của RNA ribosome, chính vì thế nó có tác dụng tiêu diệt trực khuẩn hiếu khí gram âm và một số trực khuẩn kỵ khí khi chưa có hiện tượng kháng thuốc [2]. Trong nông nghiệp, neomycin được sử dụng như một chất điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Mặc dù thuốc kháng sinh là hữu ích cho việc điều trị các bệnh nhiễm trùng nhưng sự tồn tại của chúng trong sữa gây ảnh hưởng bất lợi tới sức khỏe cộng đồng như tạo ra các chủng vi sinh vật kháng thuốc, gây các phản ứng dị ứng. Chính vì thế các phương pháp phát hiện nhanh, hiện đại đã ra đời nhằm phát hiện nhanh chính xác dư lượng thuốc kháng sinh có trong thực phẩm nói chung và trong sữa nói riêng [3].

Trước đây, nhiều tác giả đã nghiên cứu phân tích các nhóm kháng sinh trong các nền mẫu có nguồn gốc từ động vật, có thể kể đến như: xác định định tính theo phương pháp vi sinh vật [4], bán định lượng bằng phương pháp ELISA [5], định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử [6]. Trong những năm gần đây, kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ đã và đang được nghiên cứu và áp dụng đối với các nhóm kháng sinh [7]. Với tính ưu việt và chính xác nên chỉ các phương pháp phân tích sắc ký khối phổ mới được coi là phương pháp phân tích khẳng định, có giá trị pháp lý để phát hiện và định lượng, đặc biệt đối với nhóm chất cấm hoặc các chất cần

* Điện thoại: 0945745745 Email: giang.nt@vndat.com.vn

được kiểm soát ở lượng vết hay siêu vết. Tuy nhiên, do tính phức tạp, tính đặc hiệu và khả năng không bền của kháng thể mà việc ứng dụng, vận hành ổn định và giá thành luôn là thách thức đối với người làm công tác phân tích.

Các aptamer là các RNA hay các DNA sợi đơn ngắn (thường từ 20 đến 60 nucleotide) hoặc là các đoạn peptide có khả năng gắn kết với các phân tử đích với ái lực và độ đặc hiệu cao giống như kháng thể. Tuy nhiên, chất lượng của những phân tử aptamer nhìn chung tốt hơn so với kháng thể, vì chúng được tổng hợp hóa học sau đó tinh sạch. Ngoài ra, chúng có thể được cải tiến để phù hợp với những mục đích khác nhau trong khi với kháng thể không thể đáp ứng được. Cuối cùng, những dấu hiệu nhận biết của kháng thể có thể làm mất đi ái lực gắn của nó với những phân tử đích, trong khi aptamer có thể thay đổi vị trí đánh dấu sao cho phù hợp nhất với những phân tử đích của chúng [8].

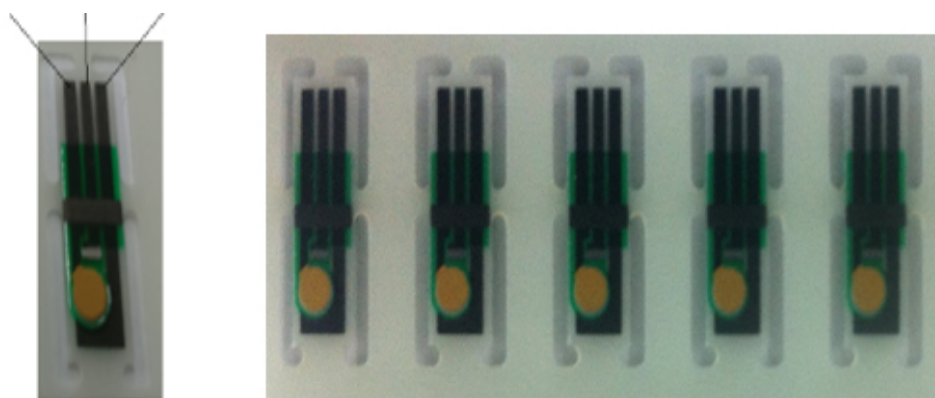
Gần đây, nhiều bài báo đã mô tả sự kết hợp giữa các cảm biến điện hóa với các aptamer tạo aptasensor điện hóa ứng dụng trong xác định nhiều phân tử đích khác nhau [9]. Các aptasensor điện hóa phụ thuộc vào việc cố định aptamer lên bề mặt điện cực. Sự thay đổi trạng thái của một bề mặt điện cực xảy ra bởi sự tương tác giữa các thụ thể (aptamer) gắn trên bề mặt điện cực với các phân tử đích làm thay đổi trở kháng và điện dung của giao diện điện cực. Vì vậy, phân tích điện thế và trở kháng là kỹ thuật rất hiệu quả và được sử dụng rộng rãi trong các cảm biến điện hóa. Bên cạnh đó, phân tích điện hóa là một trong những nền tảng cảm biến hấp dẫn nhất do sự đơn giản, nhanh chóng trong việc phát hiện, chi phí thấp và dễ dàng thu nhỏ kích thước, đó là các yếu tố cần thiết cho cảm biến sinh học [10]. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu và phát triển bộ kit phát hiện kháng sinh neomycin bằng phương pháp điện hóa nhằm phát hiện nhanh kháng sinh neomycin trong sữa

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu gồm: aptamer Neo6: 5'-SH-AGAGTCTGAGTAG-GATGAGACTAGACAAGGTCCAGGGGG-3' (IDT), Chip nano vàng (Nhật Bản) là 1 chip có đường kính là 2,2 mm, được tích hợp 3 điện cực điện cực làm việc (Au), điện cực đối (Pt), điện cực so sánh (Ag/AgCl) (Hình 1).

ĐC làm việc (Au) ĐC đối (Pt) ĐC so sánh (Ag/AgCl)



Hình 1. Hình ảnh cấu tạo của chip nano vàng

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Hóa chất dùng trong nghiên cứu gồm: $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$, KCl, BSA (Bovine serum albumin), kháng sinh neomycin (Sigma), PBS (Phosphate Buffered Saline) và một số hóa chất tinh khiết khác đều được mua của các hãng uy tín (gồm Merck, Thermo fisher, Luminex,...).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị aptamer

Aptamer đặc hiệu kháng sinh đích đã được phòng Công nghệ tế bào động vật- Viện công nghệ sinh học sàng lọc thuộc Viện Hàn Lâm Khoa Học Việt Nam, xác định trình tự và đặt công ty IDT tổng hợp SH hoá đầu 5', sau đó aptamer được pha với các nồng độ khác nhau phục vụ cho nghiên cứu.

2.3.2. Cố định aptamer lên chip nano vàng

Điện cực vàng chip có đường kính 2 mm đã được xử lý, quét thế vòng tuần hoàn (CV) trong dung dịch điện li ($K_4Fe(CN)_6$ 5 mM + $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM để kiểm tra tính thuận nghịch của hệ. Các phép đo quét thế vòng tuần hoàn được thực hiện theo chế độ sau: Điện áp: $U_1 = -0,3$ V đến $U_2 = 0,9$ V, tốc độ quét $V = 0,1$ V/s. Sau đó nano chip được nhúng vào 2 μ M aptamer đặc hiệu kháng sinh đích trong PBS (Phosphate Buffered Saline) (10 mM, pH 7,4). Sau 2 giờ, các aptamer được hấp thụ trên điện cực vàng, để loại bỏ các aptamer không cố định, tiến hành rửa sạch bằng nước. Đo phổ trở kháng điện hóa (EIS) ở mỗi bước thay đổi [11].

2.3.3. Đo điện hóa và phân tích tín hiệu EIS trong dung dịch đệm

Aptasensor đã được chuẩn bị ở mục 2.3.1, được ủ trong đệm có chứa kháng sinh đích với các nồng độ 1,0, 10, 100, 500, 1.000 và 3.000 ng/L, ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau khi rửa bằng nước sạch để loại bỏ các thành phần không đặc hiệu, tiến hành đo EIS. Tất cả các phép đo điện hóa đều tiến hành trong dung dịch điện li ($K_4Fe(CN)_6$ 5 mM + $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM + KCl 0,1 M). Chúng được ghi lại bằng cách đặt một điện thế tương đương với điện thế của mạch hở, 0,22 V (so với điện cực Ag/AgCl) trên dải tần 100 kHz - 10 MHz. Kết quả EIS của aptasensor đã được ghi lại và phân tích, xây dựng mối tương quan giữa nồng độ kháng sinh và trở kháng [12].

2.3.4. Phương pháp chuẩn bị mẫu phân tích so sánh với LC/MS

Các mẫu sữa do Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia chuẩn bị và cung cấp, bao gồm các mẫu sữa có và không bổ sung kháng sinh: Cân chính xác 50 g sữa trắng vào ống ly tâm 50 mL rồi tiến hành thêm chuẩn kháng sinh ở các mức hàm lượng khác nhau. Lắc đều mẫu cho đồng nhất. Bảo quản mẫu ở 2°C - 8°C. Sau đó, các mẫu sữa sẽ phân tích theo phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS) đã được công nhận ISO/IEC 17025 [13].

2.3.5. Phương pháp xác định độ nhạy, độ đặc hiệu [14]

Độ nhạy, độ đặc hiệu của aptasensor sẽ được tính sau khi xác định được số dương tính giả (FP) và âm tính giả (FN), cũng như dương tính thật (TP), và âm tính thật (TN) theo công thức sau đây:

$$\text{Độ nhạy} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Độ đặc hiệu} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}}$$

Kiểm tra tính đặc hiệu: cân chính xác 50 g sữa trắng vào ống ly tâm 50 mL rồi tiến hành thêm chuẩn kháng sinh theo Bảng 1. Lắc đều mẫu cho đồng nhất. Bảo quản mẫu ở 2 - 8°C. Các mẫu được tách chiết, ủ với aptasensor và tiến hành đo EIS.

Bảng 1. Các thông số tối ưu tự động của thiết bị ICP-MS

<i>TT</i>	<i>Mã mẫu</i>	<i>Loại mẫu</i>
1	<i>DDH1</i>	Mẫu trắng
2	<i>DDH2</i>	Mẫu trắng
3	<i>DDH3</i>	Dung dịch chuẩn neomycin nồng độ 10 ppb trong dung môi MeOH
4	<i>DDH4</i>	Dung dịch chuẩn neomycin nồng độ 10 ppb trong dung môi MeOH
5	<i>DDH5</i>	50 mL dung dịch chuẩn neomycin 10 ppm
6	<i>DDH6</i>	50 mL dung dịch chuẩn neomycin 10 ppm
7	<i>DDH7</i>	50 mL dung dịch chuẩn oxytetracycline 10 ppm
8	<i>DDH8</i>	50 mL dung dịch chuẩn oxytetracycline 10 ppm
9	<i>DDH9</i>	50 mL dung dịch chuẩn gentamycin 10 ppm
10	<i>DDH10</i>	50 mL dung dịch chuẩn gentamycin 10 ppm

2.3.6. Phương pháp tách kháng sinh trong các mẫu sữa

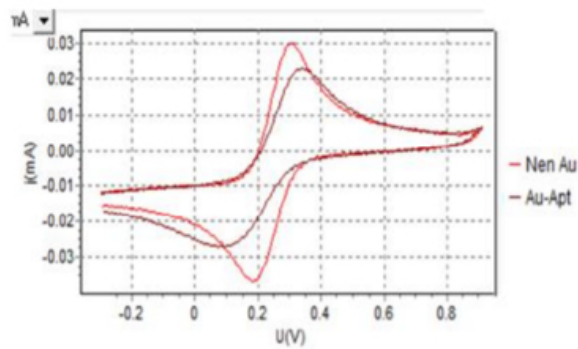
Các mẫu sữa được thu nhận và xử lý trước với acid trichloroacetic, sau đó tiến hành các bước như sau [3]:

- Dung dịch 2 % acid trichloroacetic được thêm vào mẫu sữa trong ống ly tâm, trộn đều và siêu âm 30 phút.
- Ly tâm 10.000 vòng/phút, trong 8 phút.
- Lọc dịch ly tâm qua màng lọc 0,2 µm (Polyvinylidene fluoride- PVDF) để loại bỏ lipid.
- Điều chỉnh pH về trung tính (pH 7,0) bằng NaOH, bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích điện hóa.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Gắn aptamer đặc hiệu neomycin lên chip nano vàng tạo aptasensor

Aptamer Neo6 SH hóa đầu 5' được gắn lên chip nano vàng trong 2 giờ. Kiểm tra sự gắn kết điện hóa bằng kỹ thuật quét thế vòng (CV) trong dung dịch Fero/Ferixianua. Kết quả thể hiện trên Hình 2.



Hình 2. Giản đồ thế vòng của chip nano vàng và chip nano vàng - aptamer
Tiến hành đo tín hiệu điện hóa, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

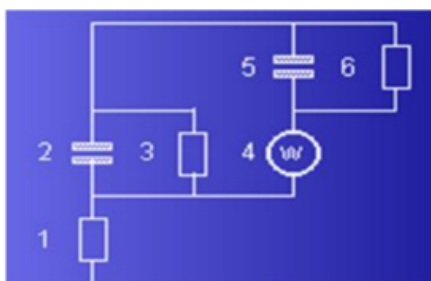
Bảng 2. Tín hiệu điện hóa khi quét thế vòng của chip nano vàng và chip nano vàng aptamer

Điện cực	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (V)	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)
Chip nano vàng	328,5	205,9	142,6	142,6	24,07
Chip nano vàng-aptamer	359,1	110,02	269,08	269,08	14,21

So sánh kết quả thu được ở Bảng 2 và Hình 2 ta thấy, tín hiệu thu được khi quét chip nano vàng chưa gắn SH-DNA đo trong cùng điều kiện. Chip nano vàng sau khi gắn SH-DNA cho tín hiệu dòng pic oxy hóa khử Fe^{2+} , Fe^{3+} giảm, hiệu giữa 2 giá trị thế đỉnh pic oxy hóa và pic khử tăng lên so với chip nano vàng khi chưa gắn SH-DNA. Điều đó chứng tỏ, aptamer đã được gắn lên bề mặt điện cực vàng làm cản trở sự trao đổi điện tích cặp Fe^{2+}/Fe^{3+} .

3.2. Đánh giá hoạt động của aptasensor bằng kỹ thuật phổ trở kháng điện hóa- EIS

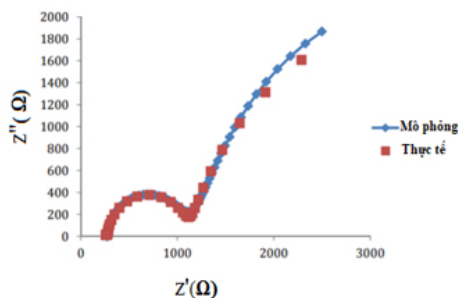
Kỹ thuật phổ trở kháng điện hóa (EIS) là một kỹ thuật nhạy để nghiên cứu các đặc tính bề mặt của các điện cực được biến tính. Sau khi nhúng aptasensor vào đệm có chứa kháng sinh với các nồng độ 1,0, 10, 100, 500, 1.000, 3.000 ng/mL. Để xác định biến đổi điện hóa sau khi ủ với kháng sinh neomycin, EIS thường được phân tích bằng cách sử dụng một mạch điện tương đương. Mạch tương đương được áp dụng sao cho phù hợp giữa dữ liệu thực tế và dữ liệu mô phỏng. Phổ trở kháng thu được với sự hiện diện các nồng độ kháng sinh khác nhau được mô hình bởi mạch điện tương đương như trong Hình 3.



Hình 3. Xây dựng mạch điện tương đương của phản ứng điện hóa khi đo dung dịch đệm với các nồng độ kháng sinh khác nhau bằng aptasensor

Mạch tương đương là một sự kết hợp của: Điện trở dung dịch (1), điện dung lớp kép (2), điện trở phân cực màng chíp (3), điện trở khuếch tán (4), điện dung lớp kép lỗ xốp (5), điện trở truyền điện tích (6).

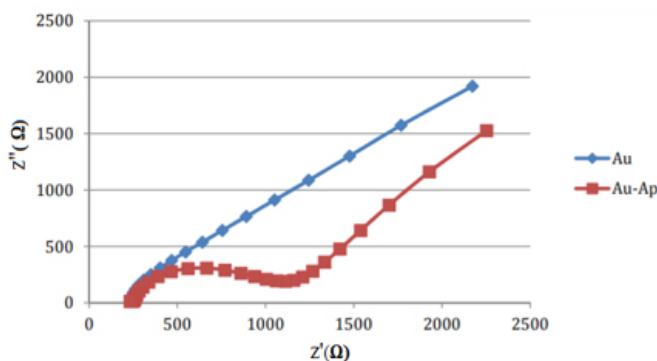
Tiến hành xây dựng giản đồ Nyquist dựa trên mô hình mạch tương đương. Kết quả thể hiện qua Hình 4.



Hình 4. Giản đồ Nyquist mô phỏng và thực tế theo mô hình mạch tương đương

Phổ Nyquist của các điện cực sau khi biến tính cho thấy một vòng bán nguyệt, theo sau là một đuôi thẳng. Phần bán nguyệt minh họa cho quá trình chuyển điện tử, trong khi phần thẳng thể hiện cho tính chất khuếch tán điện hóa. Đường kính vòng bán nguyệt đặc trưng cho trở kháng (Ret) của bề mặt điện cực. Kết quả ở hình 4 cho thấy đồ thị mô phỏng và thực tế trùng nhau, điều đó chứng tỏ đã xây dựng được mạch điện tương đương hợp lý. Các điều kiện này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

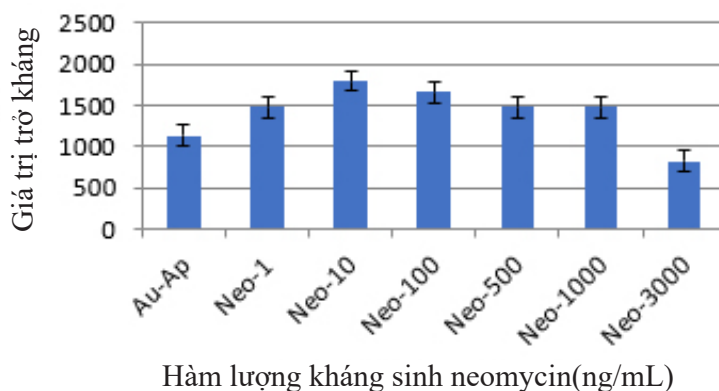
Tiếp theo, chúng tôi xây dựng giản đồ Nyquist của điện cực vàng (Au) và của điện cực Au-aptasensor. Kết quả thể hiện trên Hình 5.



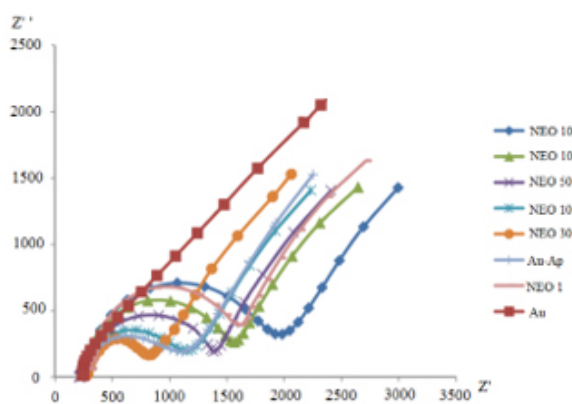
Hình 5. Giản đồ Nyquist của điện cực vàng (Au) và của điện cực Au-aptasensor

Hình ảnh cho thấy, giản đồ Nyquist của điện cực vàng chưa biến tính gần như là một đường thẳng. Sau khi biến tính aptamer đã được phủ trên bề mặt của điện cực vàng, trở kháng tăng lên đáng kể. Sau khi ủ aptasensor với các nồng độ kháng sinh neomycin khác nhau, Hình 6 cho thấy xu hướng biến đổi của aptasensor tương ứng với nồng độ của neomycin có trong đệm. Hình 7 là giản đồ Nyquist thể hiện sự biến thiên của aptasensor khi thay đổi bề mặt điện cực. Như thể hiện trong đồ thị, khi tăng nồng độ neomycin từ 1 - 10 ng/mL, trở kháng tăng, nhưng sau đó, trở kháng lại giảm khi tăng nồng độ neomycin từ 10 - 3.000 ng/mL. Điều này có thể là do sự định hướng

của aptamer trên bề mặt điện cực được thay đổi từ thể ngang sang thể thẳng đứng, do hình thành liên kết giữa neomycin với aptamer. Các định hướng thẳng đứng của liên kết aptamer- neomycin đã làm tăng tính dẫn của $[Fe(CN)_6]^{3/4}$ với điện cực vàng và do đó trở kháng (Ret) giảm.

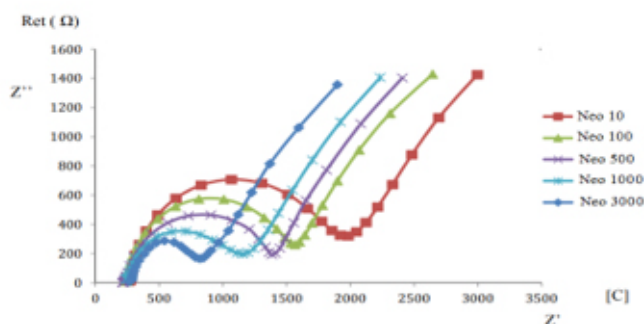


Hình 6. Đồ thị biểu hiện sự biến thiên trở kháng khi thay đổi bề mặt điện cực

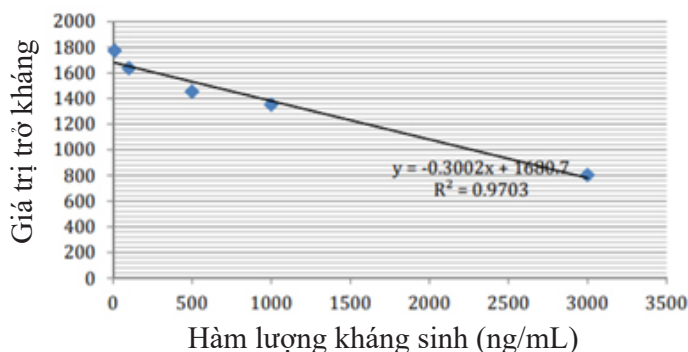


Hình 7. Giản đồ Nyquist thể hiện sự biến thiên của aptasensor khi thay đổi bề mặt điện cực

Giá trị của trở kháng Ret so với nồng độ kháng sinh neomycin là tuyến tính trong khoảng 10 - 3.000 ng/mL. Với giản đồ Nyquist của aptasensor sau khi nhúng vào kháng sinh neomycin với nồng độ 10 - 3.000 ng/mL (Hình 8) và phương trình tuyến tính Ret (Ω) = -0,3[C] + 1680, $R^2 = 0,970$ (Hình 9)



Hình 8. Giản đồ Nyquist của aptasensor sau khi nhúng vào kháng sinh neomycin với nồng độ 10 - 3.000 ng/mL



Hình 9. Đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa trở kháng và nồng độ kháng sinh trong mẫu phân tích

Như vậy, chúng tôi đã chế tạo thành công aptasensor có khả năng xác định dư lượng neomycin trong sữa với khoảng tuyến tính là 10 - 3.000 ng/mL. Tuy nhiên, aptasensor cần được đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy trước khi áp dụng thực tế.

3.3. Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu và kháng sinh neomycin trong mẫu sữa

3.3.1. Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu

Sử dụng 10 lô sữa đã được xác định là mẫu âm tính (mẫu trắng) bằng phương pháp LC-MS/MS, do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia thực hiện.

$$\text{Độ nhạy} = \frac{10}{10 + 10} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Độ đặc hiệu} = \frac{10}{10 + 10} \times 100 = 100\%$$

Như vậy: Trong khuôn khổ nghiên cứu này, độ nhạy của aptasensor là 100 % và độ đặc hiệu là 100 %.

Kiểm tra tính đặc hiệu: Kết quả kiểm tra nhận thấy, đối với các mẫu trắng, mẫu kháng sinh gentamycin và oxytetracycline trong PBS tín hiệu trở kháng không thay đổi so với tín hiệu điện hóa của aptasensor (điện cực Au-ap). Tuy nhiên, khi neomycin được thêm dung dịch đệm, và sữa vào với nồng độ 10 ng/mL trở kháng thay đổi đáng kể. Như vậy, aptasensor đã chế tạo, có thể được sử dụng để phát hiện kháng sinh neomycin với độ đặc hiệu cao.

Khoảng phát hiện của aptasensor điện hóa thu được cho thấy có tương đồng với một số nghiên cứu khác trên một số kháng sinh khác. Ví dụ nhóm nghiên cứu Zhu và cộng sự [15] đã chế tạo aptasensor điện hóa bằng cách sử dụng polyme dẫn điện/tổ hợp nano vàng tự chế tạo và áp dụng nó để xác định kanamycin với độ nhạy cao. Cảm biến cho kanamycin được chế tạo bằng cách cố định aptamer kanamycin lên bề mặt điện cực AuNP đã phủ/điện phân polyme dẫn AuNP bao gồm poly-(2,5-di-(2-thienyl)-1H-pyrrole-1-(acid p-benzoic)) như một cảm biến. Nồng độ kanamycin được xác định bằng phép đo Von-Ampe. Giới hạn phát hiện của cảm biến là $9,4 \pm 0,4$ nmol/L. Hay trong một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Falan Li cùng cộng sự [16] đã sử dụng RNA-aptasensor

sandwich và phương pháp điện hóa phát hiện neomycin trong sữa. Phạm vi tuyến tính là 5×10^{-3} nM đến 5×10^2 nM và giới hạn phát hiện đối với aptasensor là 0,759 nM. Hơn nữa, theo quy chuẩn của Việt Nam, giới hạn dư lượng kháng sinh neomycin có trong sữa là 1500 ng/mL [17]. Do đó, khoảng phát hiện của aptasensor có thể đáp ứng để áp dụng aptasensor cho phân tích các mẫu sữa, cung cấp thêm một phương pháp để kiểm soát an toàn thực phẩm.

3.3.2. Xác định kháng sinh neomycin trong mẫu sữa

Sau khi so sánh kết quả thu được khi sử dụng phương pháp LC-MS/MS và phương pháp điện hóa bằng dãy số bằng hàm Ttest, kết quả $p = 0,127 > 0,05$ cho thấy sự sai khác giữa hai dãy số là không có ý nghĩa. Như vậy, kết quả phân tích hàm lượng neomycin bằng phương pháp LC-MS/MS và aptasensor điện hóa trong 20 mẫu thu thập ngoài thị trường và mẫu bổ sung kháng sinh không có sự sai khác đáng kể. Kết quả thể hiện tại Bảng 3.

Bảng 3. Bảng số liệu kết quả xác định kháng sinh neomycin trong mẫu bằng phương pháp LC-MS/MS và aptasensor

<i>TT</i>	<i>Tên mẫu</i>	<i>Hàm lượng neomycin (µg/kg) bổ sung vào mẫu</i>	<i>Hàm lượng neomycin (µg/kg) phân tích bằng aptasensor</i>	<i>Hàm lượng neomycin (µg/kg) phân tích bằng LC-MS/MS</i>
1	Mẫu thêm chuẩn TH10	10	8,4	9,2
2	Mẫu thêm chuẩn TH50	50	47,2	48
3	Mẫu thêm chuẩn TH100	100	135	136
4	Mẫu thêm chuẩn TH200	200	183,5	185
5	Mẫu thêm chuẩn TH300	300	298,1	299
6	Mẫu thêm chuẩn TH400	400	379	280
7	Mẫu thêm chuẩn TH500	500	766,5	674
8	Mẫu thêm chuẩn TH600	600	543,4	544
9	Mẫu thêm chuẩn TH800	800	654,3	655
10	Mẫu thêm chuẩn TH1000	1000	1232,7	1145
11	Sữa tiệt trùng ít béo chứa Canxi	0	KPH	KPH
12	Sữa Hi-Land Mộc Châu	0	KPH	KPH
13	Sữa tươi tiệt trùng có đường Mộc Châu	0	KPH	KPH
14	Sữa tiệt trùng hương dưa Izzi	0	KPH	KPH

<i>TT</i>	<i>Tên mẫu</i>	<i>Hàm lượng neomycin ($\mu\text{g}/\text{kg}$) bổ sung vào mẫu</i>	<i>Hàm lượng neomycin ($\mu\text{g}/\text{kg}$) phân tích bằng aptasensor</i>	<i>Hàm lượng neomycin ($\mu\text{g}/\text{kg}$) phân tích bằng LC-MS/MS</i>
15	<i>Sữa tiệt trùng có đường KUN</i>	0	KPH	KPH
16	<i>Sữa tươi 100% có đường DUTCH LADY</i>	0	KPH	KPH
17	<i>Yomost thức uống từ sữa chua lên men tự nhiên</i>	0	KPH	KPH
18	<i>Sữa tươi nông trại Ba Vì có đường</i>	0	KPH	KPH
19	<i>Sữa tươi 100% ít đường Vinamilk</i>	0	KPH	KPH
20	<i>Sữa tươi 100% ít đường Vinamilk</i>	0	KPH	KPH

Ghi chú: KPH – Không phát hiện

4. KẾT LUẬN

Dựa trên aptamer đặc hiệu neomycin và chip nano vàng, chúng tôi đã xây dựng thành công aptasensor điện hoá xác định dự lượng định dư lượng neomycin trong sữa với khoảng tuyến tính là 10 - 3.000 ng/mL. Độ nhạy và độ đặc hiệu của aptasensor điện hóa là 100 %. Kết quả phân tích trên 20 mẫu thử cho thấy việc phân tích sữa bằng aptasensor không có sự khác biệt có ý nghĩa so với phương pháp LC-MS/MS.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ của Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. A. Waksman, and H. A. Lechevalier, "Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms," *Science*, vol. 109, pp. 305-307, 1949.
- [2]. GT Dow, JB Thoden, and HM Holden, "The three-dimensional structure of NeoB: An aminotransferase involved in the biosynthesis of neomycin," *Protein Sciemce*, vol. 27, pp. 945-956, 2018.

- [3]. C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer, and A. Okoh, "Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications," *Molecules*, vol. 23, pp. 795, 2018.
- [4]. T. Kusano, M. Kanda, K. Kamata, and T. Miyazaki, "Microbiological method for the detection of antibiotic residues in meat using mixed-mode, reverse-phase and cation-exchange cartridge," *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, vol. 45, pp. 191-196, 2004.
- [5]. S. Ahmed, J. Ning, D. Peng, T. Chen, I. Ahmad, A. Ali, Z. Lei, M. A. bakr Shabbir, G. Cheng, and Z. Yuan, "Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review," *Food and Agricultural Immunology*, vol.31, pp. 268-290, 2020.
- [6]. C. Yan, J. Zhang, L.Yao, F. Xue, J. Lu, B. Li, and Wei Chen, "Aptamer-mediated colorimetric method for rapid and sensitive detection of chloramphenicol in food," *Food Chem*, vol. 260, pp. 208-212, 2018.
- [7]. R. Mirzaei , M. Yunesian, S. Nasserri, M. Gholami, E. Jalilzadeh, S. Shoeibi , H. A. Mesdaghinia, "An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology - central composite design," *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, vol. 15, pp. 21, 2017.
- [8]. A. D. Keefe, S. Pai, and A. Ellington, "Aptamers as therapeutics," *Nature Review. Drug Discovery*, vol. 9, no. 7, pp. 537-550, 2010.
- [9]. N. R. Ha, I. P. Jung, I. J. La, H. S. Jung, and M. Y. Yoon, "Ultra-sensitive detection of for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor," *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 40305, 2017.
- [10]. Z. Li, M. A. Mohamed, A. M. Vinu Mohan, Z. Zhu, V. Sharma, G. K. Mishra, and R. K. Mishra, "Application of electrochemical toward clinical diagnostics, food, and environmental monitoring: review," *Sensors (Basel)*, vol. 19, pp. 5435, 2019.
- [11]. D. Sharma, J. Lee, J. Seo, and H. Shin, "Development of a sensitive electrochemical enzymatic reaction-based cholesterol biosensor using nano-sized carbon interdigitated electrodes decorated with gold nanoparticles," *Sensors*, vol. 17, pp. 2128, 2017.
- [12]. A. Salek Maghsoudi, S. Hassani, and M Rezaei Akmal, "An electrochemical aptasensor platform based on flower-like gold microstructure-modified screen-printed carbon electrode for detection of serpin A12 as a type 2 diabetes biomarker," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15, pp. 2219-2230, 2020.
- [13]. Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần LC-MS/MS, [Trực tuyến]. Địa chỉ <https://nifc.gov.vn/index.php/vi/tblvhh/1458-ha-thang-sac-ka-lang-khai-pha-hai-lan-lc-ms-ms>[Truy cập 27/9/ 2021].
- [14]. S. Ghoneim, Accuracy, Recall, Precision, F-Score & Specificity, which to optimize on?, Medium.<https://towardsdatascience.com/accuracy-recall-specificity-which-to-optimize-on-867d3f11124> (accessed September 24, 2021).
- [15]. H. Zhu, X. Chen, Z. Zheng, X. Ke, E. Jaatinen, J. Zhao, C. Guo, T. Xie, and D. Wang, "Mechanism of supported gold nanoparticles as photocatalysts under ultraviolet and visible light irradiation," *Chemical Communications*, pp. 7524-7526, 2009.

- [16]. F. Li, X. Gao, X. Wang, Y. Guo, X. Sun, Q. Yang, and YanyanZhang, "Ultrasensitive sandwich RNA-aptasensor based on dual-signal amplification strategy for highly sensitive neomycin detection," *Food Control*, vol. 131, pp. 108445, 2022.
- [17]. Thông tư 24/2013/TT-BYT mức giới hạn tối đa dư lượng thuốc thú y, [Trực tuyến]. Địa chỉ <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Bo-may-hanh-chinh/Thong-tu-24-2013-TT-BYT-muc-gioi-han-toi-da-du-luong-thuoc-thu-y-204380.aspx> [Truy cập 27/9/ 2021].

Developing an electrochemical aptasensor using a specific aptamer to detect neomycin antibiotic in milk

Nguyen Trung Giang^{1,2} , Le Quang Huan²

¹Viet Nam Development for Applied Technologies Limited Company - VNDAT Co., Ltd, Hanoi, Vietnam

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam

Abstract

Milk and dairy products, often considered healthy and nutritionally balanced natural foods, include essential nutrients for all ages and are an important part of the daily diet. However, the indiscriminate use of antibiotics, more than the allowable dose, and improper purposes makes food and animal products in general and dairy at risk of harming human health. Sensitive consumers may experience allergies or even more severe health problems. Antibiotics are left over for a long time, and it will lead to antibiotic resistance, making it difficult for people to control diseases and causing many consequences in the future. There are many modern methods proposed to detect antibiotics in food. One of the main methods is the electrochemical method. In this study, we used aptamer Neo6 and gold nanochip to fabricate an electrochemical aptasensor capable of determining neomycin residues in milk with a linear range of 10 - 3,000 ng/mL as determining the accuracy of the neomycin residues in milk. The sensitivity and specificity of the aptasensor are quite high. In addition, we initially compared over 20 milk samples supplemented with antibiotics, showing similar results with those analyzed by LC-MS/MS method.

Keywords: *aptamer Neo6, electrochemistry, neomycin, gold electrode, aptasensor.*