

Phát hiện nhanh streptomycin bằng DNA aptamer và hạt nano vàng

Nguyễn Lương Hiếu Hòa¹, Ông Bình Nguyễn¹, Trần Lê Phương Duy¹, Hồ Tá Giáp¹, Lê Phương Uyên¹, Nguyễn Hoàng Dũng^{1,2,*}

¹ Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm và Công nghệ Việt Nam

*nhdung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Streptomycin là một trong những kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside được sử dụng phổ biến trong điều trị các bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn gram âm ở gia súc. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi đã dẫn đến sự tồn dư lượng thuốc kháng sinh trong thực phẩm và gây nên những tác dụng phụ nghiêm trọng, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Vì vậy, việc thiết lập một phương pháp nhanh, nhạy, đơn giản và chính xác giúp phát hiện dư lượng kháng sinh trong mẫu thực phẩm là điều hết sức cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình phát hiện nhanh streptomycin dựa trên aptamer đặc hiệu và hạt nano vàng. Theo đó, khi có sự hiện diện streptomycin, liên kết đặc hiệu giữa DNA aptamer và streptomycin sẽ cạnh tranh với liên kết giữa aptamer và các hạt nano vàng, từ đó làm giảm tính ổn định của hạt nano vàng trong dung dịch muối và thể hiện bằng sự thay đổi màu sắc của dung dịch nano vàng. Điều này có thể được nhìn thấy bằng mắt thường hoặc máy đo quang phổ. Giới hạn phát hiện streptomycin của phương pháp bằng máy đo quang phổ được xác định là 250nM và có độ đặc hiệu cao. Kết quả này cho thấy tiềm năng phát triển các sản phẩm phát hiện nhanh dư lượng kháng sinh trong thực phẩm trong tương lai.

Nhận 19.09.2018
Được duyệt 15.10.2018
Công bố 25.12.2018

Từ khóa
aptamer, streptomycin,
nano vàng,
dư lượng kháng sinh

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Streptomycin là kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside do vi khuẩn *Streptomyces griseus* làm phát sinh. Phổ kháng khuẩn của streptomycin bao gồm vi khuẩn gram âm hiếu khí và một số vi khuẩn gram dương. Kháng sinh streptomycin được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở gia súc và gia cầm [1]. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh sẽ dẫn đến việc tồn dư kháng sinh cũng như các tác dụng phụ nghiêm trọng như dị ứng, giảm thính giác, gây suy yếu chức năng gan, thận. Dù đã có rất nhiều cảnh báo về tác hại của việc lạm dụng kháng sinh, nhưng công tác kiểm soát cũng như quản lý việc sử dụng kháng sinh hiệu quả vẫn còn là một vấn đề nan giải và vẫn chưa được tiến hành một cách đồng bộ trên cả nước. Hiện nay, các phương pháp được sử dụng để phát hiện streptomycin bao gồm sắc ký lỏng hiệu năng cao, phương pháp ELISA. Các phương pháp này có một số hạn chế như giá thành cao, đòi hỏi trang thiết bị và tốn thời gian. Do đó, việc thiết lập một phương pháp nhanh, nhạy, đơn giản và chính xác giúp phát hiện dư lượng kháng sinh trong mẫu thực phẩm là điều hết sức cần thiết [2,3].

Aptamer là các oligonucleotide (ssDNA, RNA) hoặc là các phân tử peptide có cấu hình không gian đặc trưng và có khả năng gắn kết với các phân tử đích tương đương kháng thể đơn dòng. Aptamer có khả năng hình thành cấu trúc không gian ba chiều bền vững trong dung dịch. Các aptamer có nhiều ưu điểm vượt trội so với kháng thể như tính ổn định, dễ tổng hợp, không cần tới động vật thí nghiệm, có thể biến tính và hồi tính thuận nghịch, có thể biến đổi hóa học mà không ảnh hưởng tới hoạt tính gắn kết với phân tử đích [4,5]. Aptamer có thể nhận biết một khoảng rộng từ các ion, các phân tử, các chất, các độc tố, cho tới các tế bào với tính đặc hiệu cao. Các nghiên cứu cho thấy, khi gắn các hạt nano vàng với các aptamer tạo thành cấu trúc cuộn xoắn cho hiệu quả gắn chặt và ổn định aptamer hơn trong môi trường đệm [6]. Việc kết hợp aptamer với các nano kim loại trợ đạt hiệu quả cao hơn so với sử dụng riêng lẻ. Đồng thời, nano kim loại trợ càng tăng thêm tính cảm biến sinh học cho các phản ứng phát hiện bệnh và di truyền. Nghiên cứu này nhằm mục đích tiến hành xây dựng quy trình phát hiện nhanh streptomycin bằng DNA aptamer kết hợp hạt nano vàng.



2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Trình tự STR aptamer 5'-TAG GGA ATT CGT CGA CGG ATC CGG GGT CTG GTG TTC TGC TTT GTT CTG TCG GGT CGT CTG CAG GTC GAC GCA TGC GCC G-3' được tổng hợp tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc); streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, ampicillin, tetracylin, sodium tetrachloroaurate (HAuCl₄), trisodium citrate (Na₃C₆H₅O₇), NaCl, Tris-HCl được cung cấp bởi Sigma (Mỹ).

2.2 Tổng hợp dung dịch hạt nano vàng (AuNPs)

Hạt nano vàng được tổng hợp bằng cách khử muối Au(III) bằng natri citrate. Theo đó, 10ml dung dịch HAuCl₄ 1mM sẽ được khuấy đều và đun sôi. 2ml dung dịch muối natri citrate 1% được thêm vào dung dịch trên và khuấy trong vòng 10 phút. Muối natri citrate sẽ khử muối Au(III) để tạo thành dung dịch AuNPs có màu đỏ. Nồng độ của AuNPs sẽ được xác định bằng máy đo quang phổ UV/Vis. Kích thước hạt nano vàng được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).

2.3 Xác định sự hiện diện của streptomycin bằng DNA aptamer và hạt nano vàng

DNA aptamer và streptomycin được hòa tan trong dung dịch đệm Tris-HCl 20mM, NaCl 20mM, KCl 5mM. 50μl dung dịch DNA aptamer được trộn với 50μl dung dịch AuNPs và hỗn hợp này được để yên trong 10 phút. Trong quá trình này, DNA sẽ được hấp thu lên bề mặt AuNPs nhờ tương tác tĩnh điện. Nhờ đó, độ bền của các hạt AuNPs tăng lên. Các hạt AuNPs tồn tại dưới dạng riêng lẻ làm dung dịch có màu đỏ. Tiếp theo đó, 50μl dung dịch streptomycin được thêm vào dung dịch trên. Streptomycin sẽ liên kết với DNA aptamer tạo thành phức hợp DNA aptamer/streptomycin và giải phóng DNA aptamer ra khỏi bề mặt của các hạt AuNPs. Cuối cùng, bổ sung 50μl dung dịch NaCl, lúc này các hạt AuNPs trở nên kém bền và có xu

hướng liên kết lại với nhau để tạo thành các hạt AuNPs có kích thước lớn hơn. Quá trình này sẽ làm đổi màu dung dịch từ đỏ sang tím hoặc xanh. Sự đổi màu có thể quan sát bằng mắt thường hoặc định lượng bằng máy đo quang phổ UV/Vis với bước sóng từ 450nm-700nm.

2.4 Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng nhận biết của qui trình

Độ bền của phức hợp DNA aptamer/streptomycin và sự đổi màu của dung dịch AuNPs phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Các yếu tố như nồng độ muối, nồng độ DNA aptamer, nồng độ streptomycin ảnh hưởng đến khả năng nhận biết streptomycin của DNA aptamer - nano vàng được khảo sát. Độ đặc hiệu của phương pháp được xác định dựa trên các kháng sinh khác như chloramphenicol, ampicillin, tetracycline... để đảm bảo phương pháp đã phát triển đặc hiệu cho streptomycin.

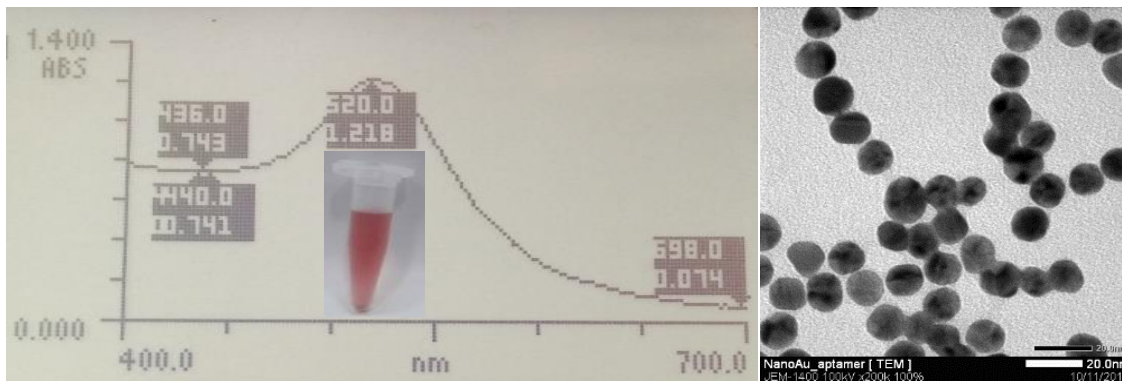
2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị số liệu được biểu thị ở giá trị trung bình ± SD (standard derivation). Sự khác biệt giữa các mẫu được kiểm tra bằng t-test, Duncane với giá trị P < 0,05 được xem là khác biệt có ý nghĩa.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tổng hợp dung dịch hạt nano vàng

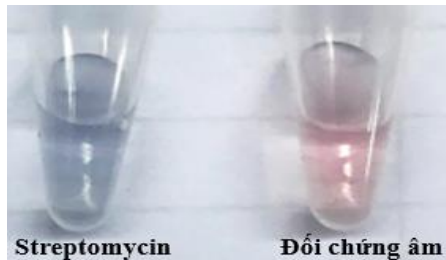
Dung dịch hạt nano vàng được tổng hợp bằng phương pháp của Chen và cộng sự từ muối vàng HAuCl₄. Dung dịch nano vàng sau khi tổng hợp được đo phổ UV Vis quét bước sóng từ 400 đến 700nm và chụp TEM để xác định kích thước. Kết quả cho thấy dung dịch nano vàng sau khi tổng hợp được hấp thụ tại bước sóng cực đại 520nm và có kích thước tương đối đồng đều giữa các hạt, đường kính các hạt dao động từ 10,8-17,4nm; đường kính trung bình là 13,4nm (Hình 1). Như vậy, hạt nano vàng sau khi tổng hợp đã đạt được yêu cầu về kích thước mong muốn từ 10-15nm, phù hợp với những nghiên cứu trước đó [8].



Hình 1 Phổ UV-Vis và kích thước hạt nano vàng

3.2 Nhận biết streptomycin bằng DNA aptamer và hạt nano vàng

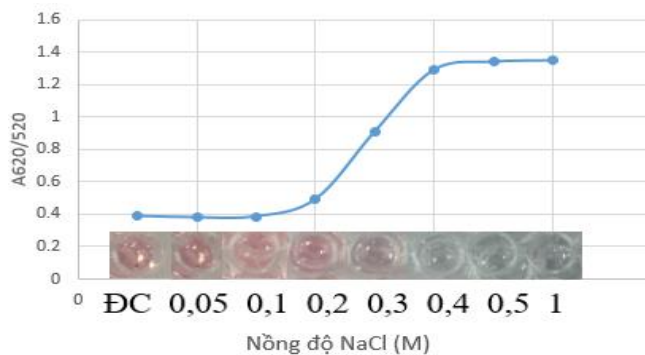
Để kiểm tra khả năng nhận biết streptomycin bằng DNA aptamer và hạt nano vàng, streptomycin nồng độ 500nM được trộn với phức hợp DNA aptamer - hạt nano vàng. Sự thay đổi màu sắc của hỗn hợp có thể được nhận biết bằng mắt thường hoặc đo OD ở các bước sóng 520nm và 620nm. Kết quả cho thấy phức hợp DNA aptamer - hạt nano vàng có khả năng kết hợp với streptomycin và làm đổi màu dung dịch từ đỏ sang tím (Hình 2).



Hình 2 Dung dịch aptamer-AuNP đổi màu khi có sự hiện diện Streptomycin

3.3 Ảnh hưởng của nồng độ NaCl

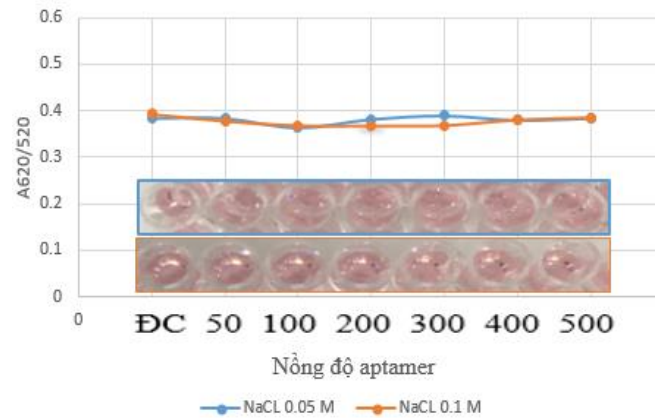
Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến quá trình phát hiện streptomycin, nồng độ muối NaCl sẽ được thay đổi từ 0 – 1M (Hình 3). Kết quả cho thấy, màu sắc của phức hợp AuNPs/aptamer có sự thay đổi từ đỏ hồng sang tím và xanh và giá trị A620/520 có sự tăng dần. Cụ thể ở nồng độ NaCl 0,05M và 0,1M dung dịch AuNPs/aptamer không có sự thay đổi màu sắc và giá trị A620/520 không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, khi nồng độ NaCl tăng lên 0,2M thì dung dịch chuyển sang màu tím và giá trị A620/520 tăng lên. Với nồng độ NaCl tăng từ 0,3M trở lên thì dung dịch chuyển sang xanh, giá trị A620/520 tăng cực đại và ảnh hưởng lớn đến dung dịch chứa phức hợp AuNPs/aptamer. Dựa vào kết quả trên, nhận thấy ở nồng độ 0,05M và 0,1M NaCl không làm biến tính dung dịch chứa phức hợp AuNPs/aptamer, không ảnh hưởng đến qui trình phát hiện streptomycin. Tuy nhiên, xét về hiệu quả kinh tế, nên lựa chọn nồng độ NaCl là 0,05M để thực hiện các khảo sát các yếu tố tiếp theo của qui trình phát hiện.



Hình 3 Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến độ bền của AuNPs/aptamer

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ DNA aptamer

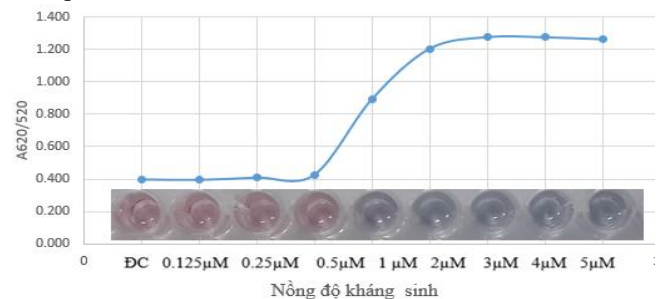
Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ DNA aptamer lên quá trình phát hiện streptomycin, nồng độ DNA aptamer từ 0 – 500nM được khảo sát (Hình 4). Dựa vào kết quả so màu và giá trị A620/520, nhận thấy, khi tăng nồng độ DNA aptamer, màu của dung dịch AuNPs/aptamer và giá trị A620/520 ở 2 nồng độ muối 0,05M và 0,1M không có sự thay đổi nhiều so với mẫu đối chứng. Vì vậy, có thể kết luận nồng độ DNA aptamer hầu như không ảnh hưởng đến dung dịch chứa phức hợp AuNPs/aptamer. Nhằm mang lại hiệu quả kinh tế nồng độ DNA được chọn cho qui trình là 50nM.



Hình 4 Ảnh hưởng của nồng độ aptamer

3.5 Khảo sát độ nhạy của qui trình

Độ nhạy của qui trình được khảo sát ở các nồng độ streptomycin khác nhau từ 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5μM để xác định giới hạn phát hiện tối thiểu của qui trình. Kết quả được thể hiện ở Hình 5.

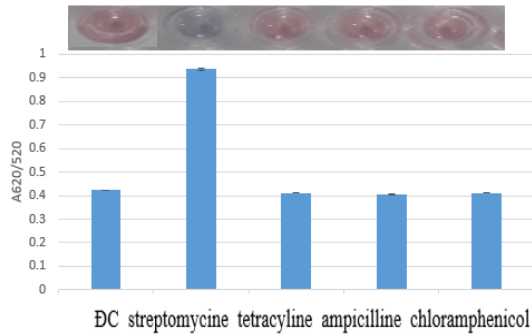


Hình 5 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh streptomycin

Từ kết quả so màu và giá trị A620/520 thể hiện ở Hình 5, nhận thấy, với nồng độ kháng sinh từ 0,125 đến 0,5μM dung dịch không có sự thay đổi màu sắc so với mẫu đối chứng. Đồng thời, giá trị A620/520 cũng không có sự thay đổi so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, khi nồng độ kháng sinh tăng lên từ 1μM trở lên, dung dịch có sự thay đổi màu sắc rõ rệt so với mẫu đối chứng, cụ thể là dung dịch chuyển sang màu xanh. Đồng thời, giá trị A620/520 tăng đột ngột so với mẫu đối chứng và đạt cân bằng tại nồng độ kháng sinh 5μM. Dựa vào kết quả trên, qui đổi về nồng độ streptomycin cuối cùng trong tổng thể tích hỗn hợp phản

ứng 200µl, có thể kết luận ngưỡng phát hiện streptomycin của qui trình (50µl AuNPs 5nM, 50µl DNA aptamer 50nM, 50µl kháng sinh streptomycin 1µM, 50µl NaCl 0,05M) là 0,25µM.

3.6 Khảo sát độ đặc hiệu của qui trình



Hình 6 Ảnh hưởng của các kháng sinh khác nhau

Để kiểm tra độ đặc hiệu của qui trình, các khảo sát đã được thực hiện với nhiều kháng sinh khác nhau, cụ thể là các kháng sinh tetracylin, ampicillin, chloramphenicol. Kết quả trình bày ở Hình 6 cho thấy, chỉ có dung dịch chứa kháng

sinh streptomycin chuyển sang màu xanh và giá trị A620/520 cũng có sự thay đổi so với mẫu đối chứng. Trong khi các kháng sinh khác, dung dịch vẫn không chuyển màu và giá trị A620/520 không có sự thay đổi so với mẫu đối chứng. Từ đó có thể kết luận, qui trình có thể phát hiện đặc hiệu kháng sinh streptomycin.

4 Kết luận

Thông qua nghiên cứu, dung dịch nano vàng có kích thước trung bình 13,4nm đã được tổng hợp thành công. Qui trình sử dụng DNA aptamer – nano vàng dùng cho phát hiện chuyên biệt streptomycin cũng được xây dựng với các thông số nồng độ NaCl là 0,05M; nồng độ DNA aptamer là 50nM, giới hạn phát hiện 0,25µM. Đây là cơ sở ban đầu cho việc phát triển kit phát hiện nhanh streptomycin trong mẫu thực phẩm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Nguyễn Tất Thành trong đề tài mã số 2018.01.06.

Tài liệu tham khảo

1. Emrani A.S, Danesh N.M, Lavaee P., Ramezani M., Abnous K., and Taghdisi S.M, Colorimetric and fluorescence quenching aptasensor for detection of streptomycin in blood serum and milk based on double-stranded DNA and gold nanoparticles. *Food Chemistry*, 190 (2016) 115-121.
2. Danesh N.M., Ramezani M., Emrani A.S., Abnous K. and Taghdisi S.M., A novel electrochemical aptasensor based on archshape structure of aptamer-complementary strand conjugate and exonuclease I for sensitive detection of streptomycin. *Biosensor and Bioelectronic* (2015) 1-16.
3. Commission Regulation (EEC) 2377/90, 1990. Official Journal of European Communication 1, L224.
4. Chen D., Yao D., Xie C., and Liu D., Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline, *Food Control* 42 (2014) 109-115.
5. Chen J., Li Z., Ge J., Yang R., Zhang L., Qu L., Wang H., and Zhang L., An aptamer-based signal-on bio-assay for sensitive and selective detection of kanamycin A by using gold nanoparticles, *Talanta*, 139 (2015) 226-232.
6. Granja R.H.M., Niño A.M.M., Zucchetti R.A.M., Niño R.E.M., Patel R., and Salerno A.G., Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(2016) 64-67.
7. Han X., Zhang Y., Nie J., Zhao S., Tian Y., and Zhou N., Gold nanoparticle based photometric determination of tobramycin by using new specific DNA aptamers. *Microchimica Acta* (2017) 68-75.
8. Keating C.D., Musick M.D., Keefe M.H., Natan M.J., Kinetics and thermodynamics of Au Colloid monolayer self-assembly: Undergraduate experiments in surface and nanomaterials chemistry. *Journal of Chemistry Education*, 76(1999) 949-955.
9. Kim Y.J, Kim Y.S, Niazi J.H, and Gu M., Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 33(1) (2010) 31-37.
10. Liu Q., Xu L., Zhang X., Li N., Zheng J., Guan M. et al., Enhanced photodynamic efficiency of an aptamer-guided fullerene photosensitizer toward tumor cells. *Asian Journal of Chemistry*, 8 (2013) 2370-2376.

Detection streptomycin using DNA aptamer and gold nanoparticle

Nguyen Luong Hieu Hoa¹, Ong Binh Nguyen¹, Tran Le Phuong Duy¹, Ho Ta Giap¹, Le Phuong Uyen¹, Nguyen Hoang Dung^{1,2,*}

¹ NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

² Institute of Tropical Biology, VAST

* nhdung@ntt.edu.vn

Abstract Streptomycin is one of common antibiotics belongs to aminoglycoside group that is widely used for treatment of gram-negative infectious diseases in fodder animals. However, incorrect and uncontrolled application of streptomycin could result in the presence of residues of this drug in foodstuffs and causes serious side effects on human. Therefore, it is very important to develop a rapid, simple and specific method to detect streptomycin in food products. In this study, a rapid method based on a streptomycin-specific aptamer and gold nanoparticle was developed for detection of streptomycin. In the presence of streptomycin, the competitive binding of the target and the DNA aptamer decreases the stability of gold nanoparticle in NaCl solution, triggers the aggregation, and exhibits visible color change of gold nanoparticle solution. This change can be seen by naked eye or UV-vis. Through UV-vis spectroscopic quantitative analysis, streptomycin can be detected at the concentration of 250nM. The presence of other aminoglycoside antibiotics shows neglectable disturbance. These results showed the established method may have enormous potential utility for practical streptomycin in food products in the future.

Keywords aptamer, detection, streptomycin, gold nanoparticle.

