

TUYỂN CHỌN APTAMER CÓ ĐỘ NHẠY VÀ ĐẶC HIỆU CAO ĐỐI VỚI MELAMINE BẰNG KỸ THUẬT SELEX

SV. Tạ Bích Hồng¹, SV. Lê Văn Minh¹, ThS. Hoàng Lê Minh², TS. Trịnh Hồng Kiên¹

¹Trường Đại học Hòa Bình

²Đại học Phenikaa

Tác giả liên hệ: trinhhongkien@gmail.com

Ngày nhận: 14/7/2025

Ngày nhận bản sửa: 12/8/2025

Ngày duyệt đăng: 25/8/2025

DOI: <https://doi.org/10.71192/987362noqxp>

Tóm tắt

Melamine là hợp chất tổng hợp giàu nitơ, từng bị lạm dụng trong thực phẩm nhằm tăng giả tạo hàm lượng protein. Tuy nhiên, đây là chất độc có thể gây tổn thương thận và hệ tiết niệu khi tích lũy ở nồng độ cao. Do đó, việc phát triển phương pháp phát hiện melamine nhanh, nhạy và chính xác là cần thiết trong kiểm nghiệm an toàn thực phẩm. Nghiên cứu này trình bày quá trình tuyển chọn aptamer DNA đặc hiệu với melamine bằng kỹ thuật SELEX. Sau 12 vòng sàng lọc, hai aptamer Mel01AS và Mel02AS có ái lực cao với melamine (giá trị K_d lần lượt 16 nM và 40 nM) đã được thu nhận. Đặc tính liên kết và độ nhạy được đánh giá bằng điện di gel và huỳnh quang học. Các aptamer này cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong phát triển cảm biến sinh học nhằm phát hiện nhanh melamine trong thực phẩm.

Từ khóa: Melamine, Aptamer, SELEX, Biosensor.

Aptamers selection for melamine by the SELEX method

Ta Bích Hồng¹, Lê Văn Minh¹, Hoàng Lê Minh, MA. ², Dr. Trinh Hong Kien¹

¹Hoa Binh University

²Phenikaa University

Corresponding Author: trinhhongkien@gmail.com

Abstract

Melamine, a nitrogen-rich industrial compound, has been illicitly added to food products to falsify protein content, posing serious health risks. Ingestion of melamine-contaminated food, especially milk, can lead to renal damage, urinary tract disorders, and even death. Therefore, developing rapid, accurate, and sensitive detection methods is essential for food safety monitoring. Traditional techniques such as HPLC and GC, while reliable, are costly, time-consuming, and require skilled technicians. In this study, we employed the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) method to generate DNA aptamers specifically binding to melamine. After twelve selection cycles, two aptamers, Mel01AS and Mel02AS, were obtained, exhibiting strong binding affinities with dissociation constants (K_d) of 16 nM and 40 nM, respectively. Their binding characteristics were confirmed through electrophoresis and fluorescence analysis. These aptamer-based biosensors offer a promising, efficient alternative for melamine detection in food, contributing to safer and more accessible monitoring practices.

Keywords: Melamine, Aptamer, SELEX, Biosensor.

1. Đặt vấn đề

Melamine, công thức hóa học ($C_3H_6N_6$) là một hợp chất hữu cơ giàu nitơ, được sử dụng phổ biến trong công nghiệp sản xuất nhựa, sơn và keo dán. Tuy nhiên, chất này đã bị phát hiện trong nhiều vụ bê bối an toàn thực phẩm do bị trộn lẫn vào sữa, sữa bột hoặc thức ăn chăn nuôi để làm tăng giá trị protein giả tạo, gây tổn thương thận, đặc biệt nghiêm trọng ở trẻ

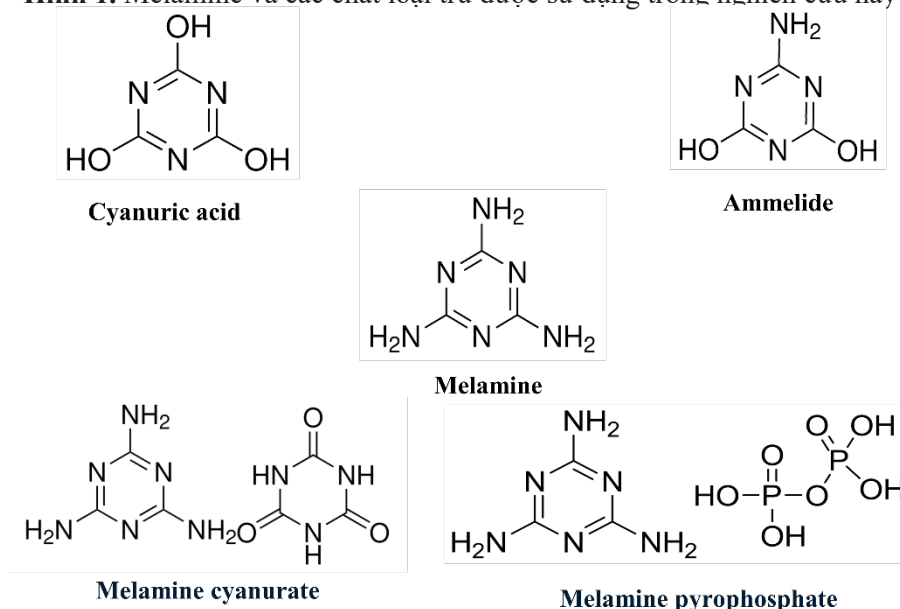
em và có thể dẫn đến tử vong [1-5]. Hiện nay, các phương pháp phát hiện melamine có độ chính xác và độ nhạy cao như LC/MS, GC/MS và HPLC đã được phát triển [6-8]. Tuy nhiên, những phương pháp này đòi hỏi trang thiết bị công kênh, quy trình xử lý mẫu phức tạp, chi phí cao và cần kỹ thuật viên lành nghề. Ngoài ra, mẫu thực phẩm phải được vận chuyển đến phòng thí nghiệm để phân tích, gây bất tiện trong

kiểm soát an toàn thực phẩm quy mô lớn. Do đó, việc phát triển các cảm biến tại chỗ có độ nhạy cao, đặc hiệu, giá thành thấp và dễ triển khai là nhu cầu cấp thiết [9-10].

Tuy đã có một số loại cảm biến tại chỗ được phát triển, nhưng vẫn tồn tại những hạn chế nhất định, đặc biệt trong khâu chuẩn bị mẫu từ sữa tươi, dù ít phức tạp hơn so với các kỹ thuật phân tích bằng thiết bị hiện đại. Aptamer là các phân tử DNA hoặc RNA mạch đơn có khả năng thay đổi hình dạng để gắn kết đặc hiệu với phân tử đích thông qua các tương tác phi cộng hóa trị như liên kết hydro, tương tác π - π , và lực Van der Waals. Với ưu điểm ổn định, dễ tổng hợp, có thể chỉnh sửa và có thể thu hồi

không gây ô nhiễm môi trường. Các cảm biến aptamer đang là ứng viên tiềm năng thay thế kháng thể trong các ứng dụng chẩn đoán, điều trị và kiểm định các chất gây ô nhiễm môi trường [11-15]. Phương pháp SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) là kỹ thuật tuyển chọn invitro giúp chọn lọc aptamer có ái lực cao từ thư viện ngẫu nhiên gồm hàng tỷ chuỗi axit nucleic [16-17]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng và tối ưu quy trình SELEX để tạo ra các aptamer đặc hiệu với melamine, đồng thời, bước đầu đánh giá hiệu quả của cảm biến aptamer trong phát hiện melamine trong mẫu sữa.

Hình 1. Melamine và các chất loại trừ được sử dụng trong nghiên cứu này



2. Cơ sở lý luận và phương pháp

2.1. DNA Oligonucleotides và hóa chất

Tất cả các Oligonucleotide DNA được mua từ Công ty Cosmogenetech co, Ltd (Deajeon-si, Hàn Quốc). Mọi hóa chất thông thường như HCl, NaOH, KCl, HEPES, TBE, TAE, MgCl₂, và bột agarose được mua từ Sigma-Aldrich co, Ltd (Hàn Quốc). Nước được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm là nước cất khử ion. Melamine, axit cyanuric, ammelide, melamine cyanurate, melamine pyrophosphate được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ). Tất cả các hóa chất và thuốc thử khác đều đạt cấp độ sinh học phân tử. Sữa được mua từ siêu thị.

2.2. Dung dịch gốc sử dụng cho SELEX

Các dung dịch gốc sau đây đã được chuẩn bị và sử dụng cho thí nghiệm

SELEX: 1 × SB (đệm SELEX): (20 mM HEPES, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM KCl, pH 7,5) được chuẩn bị như một dung dịch gốc 2 ×, sau khi điều chỉnh pH, dung dịch đệm được lọc trong chân không với cốc khử trùng 0,22 μm. Đệm tách sợi: (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,5) đệm này không có MgCl₂ vì ion Mg²⁺ có tác dụng ổn định chuỗi đối DNA. Đối với melamine và các chất khác được pha loãng trong 1 ml H₂O và tính nồng độ trước khi pha loãng đến nồng độ cuối cùng bằng nước.

2.3. Tiến trình tuyển chọn

Quy trình tuyển chọn được thực hiện theo cùng một quy trình mà Kyung-Ae Yang và cộng sự đã mô tả trong báo cáo của tác giả [18]. Đối với chu kỳ SELEX đầu tiên, tỷ lệ giữa thư viện DNA và chuỗi bắt

giữ lần lượt là 1:5, hỗn hợp oligonucleotide chứa 5.000 pmoles chuỗi bắt giữ và 1.000 pmoles thư viện ngẫu nhiên được chuẩn bị trong 250 μ L đệm SELEX 1 $\times$ và ủ ở 95°C trong 5 phút. Hỗn hợp được làm nguội từ từ đến nhiệt độ phòng (đến ~25°C, trong ít nhất 10 phút), sau đó, được thêm vào cột streptavidin-agarose.

Cột streptavidin agarose được chuẩn bị với 250 μ L streptavidin-agarose (BSA biotin hóa 1-3 mg/ml; Thermo scientific, IL, Hoa Kỳ) trong cột sắc ký microbiospin (Bio-rad, CA, Hoa Kỳ). Để cân bằng cột, streptavidin-agarose được rửa 6 lần bằng cùng một thể tích đệm SELEX 1 $\times$, sau đó, hỗn hợp Oligonucleotide đi qua cột. Hỗn hợp được thu thập và đi qua cột thêm hai hoặc ba lần nữa. Sau đó, cột được rửa mười lần hoặc nhiều hơn bằng cùng một đệm SELEX 1 $\times$. Chất rửa giải từ mỗi lần rửa này được thu thập vào các ống riêng biệt. Sau đó, phức hợp DNA-mục tiêu được giải bằng dung dịch mục tiêu ba lần, thu thập riêng từng phần đoạn 250 μ L. Các mẫu rửa giải được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR để kiểm tra hồ sơ.

PCR quy mô nhỏ (Kiểm tra): Mỗi phản ứng được thực hiện theo công thức sau: 5 μ L đệm PCR 10 $\times$, 1 μ L hỗn hợp dNTP (10 mM), 2 μ L mỗi loại mồi (mỗi loại 10 pmol/ μ L), 37,25 μ L nước không chứa DNase/RNase và 0,25 μ L Taq polymerase (5U/ μ L), thêm 2,5 μ L dung dịch khuôn mẫu từ các phần đoạn đã thu thập. Phản ứng PCR được chạy với 1 chu kỳ 95°C (2 phút), chu kỳ N là 92°C (15 giây), 59°C (30 giây), 72°C (45 giây) và 1 chu kỳ 72°C (2 phút). Tiến hành điện di với sản phẩm PCR ở 100 V trong 30 phút. Nhuộm bằng Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát các dải dưới ánh sáng UV và chụp ảnh gel agarose 3%. Số chu kỳ PCR được xác định bằng sự xuất hiện của dải DNA trong tất cả các mẫu mà không khuếch đại quá mức.

PCR quy mô lớn: Tất cả các dịch giải dương tính được kết hợp và cô đặc thành 50 μ L bằng máy ly tâm với bộ lọc 3K MWCO. Chuẩn bị 1 mL hỗn hợp PCR, nồng độ của tất cả các thuốc thử giống như trong PCR quy mô nhỏ, nhưng mồi ngược biotin được sử dụng trong các bước này. Trước tiên, lấy mẫu dung dịch 50 μ L và thực hiện PCR quy mô nhỏ để ước tính số chu kỳ PCR cần thiết để khuếch đại khuôn mẫu trên quy mô lớn. Áp dụng 8 ± 1 chu kỳ, lấy 10 μ L sản phẩm PCR để điện di, sau đó, đặt ống trở lại máy PCR và thêm 2 chu kỳ nữa, rồi lặp lại. Tiếp tục thêm trong 16 chu kỳ. 2 μ L thuốc nhuộm 6 $\times$ được

thêm vào mỗi chu kỳ. Tái tất cả các mẫu lên gel, chạy gel bằng các điều kiện giống như chúng tôi đã làm với PCR nhỏ.

Tách sợi: Máy ly tâm được sử dụng để cô đặc với bộ lọc 10K MWCO để giảm thể tích của toàn bộ sản phẩm PCR xuống còn 50 μ L. Cột sắc ký mini được chuẩn bị, 0,25 ml streptavidin agarose được thêm vào cột và rửa cột 5 - 6 lần bằng cùng thể tích đệm tách sợi để cân bằng pH. Thêm sản phẩm PCR cô đặc, thu thập dịch rửa giải và áp dụng dịch này vào cột thêm hai lần nữa. Rửa cột 10 lần bằng 0,25 ml đệm tách sợi. Thêm 300 μ L NaOH 0,2 M, ủ trong 10 phút, thu thập dịch rửa giải và thêm 100 μ L NaOH 0,2 M để thu thập lượng còn lại trong cột. Điều chỉnh pH bằng HCl đến pH 7,5. Sử dụng dải pH để kiểm tra pH, thêm cùng một thể tích đệm phản ứng 2 $\times$ SELEX. Cô đặc dung dịch bằng bộ lọc MWCO 3K thành 50 μ L. Đây là dung dịch thư viện cho chu kỳ tiếp theo của SELEX. Đo nồng độ bằng máy đo nano, lấy 100 pmol cho chu kỳ tiếp theo và bảo quản phần dung dịch còn lại ở 20°C làm dung dịch dự phòng.

Cloning: Cloning được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện theo 1 chu kỳ ở 95°C (2 phút), 9 chu kỳ ở 92°C (15 giây), 59°C (30 giây), 72°C (45 giây) và 1 chu kỳ ở 72°C (15 phút). Vector Tblunt và đoạn mồi ngược không gắn biotin được sử dụng trong bước này. Khoảng 20-30 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên trong mỗi lần nhân bản để nuôi cấy lỏng trong 3 mL môi trường LB trong >16 giờ. Plasmid được phân lập từ tế bào nuôi cấy bằng Bộ Plasmid Miniprep theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giải trình tự: Plasmid được gửi đến Công ty COSMO để giải trình tự.

2.4. Đo lường ái lực liên kết

Để vẽ đồ thị và xác định $K_{d,eff}$, nồng độ của FAM-Sensor được đặt ở mức cố định 50 nM, trong khi nồng độ của dabcyI được đánh dấu trọng chuỗi bắt giữ (chất làm nguội) thay đổi trong khoảng từ 0 đến 500 nM. Một thể tích bằng nhau của chất cảm biến và chất làm nguội cô đặc 2 $\times$, cả hai đều ở mức 1 $\times$ SB, được trộn, xử lý ở 95°C trong 5 phút và làm nguội chậm bằng cách giữ ở nhiệt độ phòng (~30 phút) đến ~25°C. Mỗi hỗn hợp được chuyển vào một giếng trong một microplate 96 giếng (bề mặt không liên kết, đáy phẳng; đĩa phân tích polystyrene đen; Corning, Corning, NY, Hoa Kỳ). Cường độ huỳnh quang của mỗi giếng được ghi lại trên đầu đọc

microplate Tecan Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ). Đo huỳnh quang được thực hiện với bước sóng kích thích 485 nm và bước sóng phát xạ 535 nm. Đường cong được vẽ bằng cách sử dụng phương pháp bình phương nhỏ phi tuyến tính, phần mềm GraphPad Prism 5.0) để tính toán $K_{d,eff1}$.

Để có thể tính toán $K_{d,eff2}$, nồng độ cuối cùng của cả cảm biến và chất dập tắt đều được giữ ở tỷ lệ đã xác định trong thí nghiệm trước đó ở mức dập tắt 90% (1:5) trong khi nồng độ chất đích và chất loại trừ được thay đổi trong khoảng từ 0 đến 500 nM. Cảm biến và chất dập tắt được trộn trong 1×SB, sau đó, hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 5 phút. Sau khi làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, một thể tích bằng nhau của (cũng trong SB) được thêm vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 40 phút. Sau đó, mỗi hỗn hợp được chuyển vào một giếng vi đĩa và cường độ huỳnh quang của nó được ghi lại. Tất cả các phép đo được thực hiện ở chín lần lặp lại. Sau đó, các giá trị cường độ huỳnh quang được vẽ bằng cách sử dụng phương pháp bình phương nhỏ phi tuyến tính bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0.

2.5. Thí nghiệm kiểm tra độ đặc hiệu

Bước này được thực hiện tương tự với những gì chúng tôi đã làm trong thí nghiệm để suy ra $K_{d,eff2}$ cho các mục tiêu dương tính. Chuẩn bị một dải dung dịch nồng độ 0-500 nM của các chất loại trừ trong nước. Aptamer gắn nhãn fluorescein và chất dập tắt gắn nhãn dabcytl (cả nồng độ của aptamer và chất dập tắt đều được cố định ở tỷ lệ 1:5) được trộn và ủ ở 95°C trong 5 phút và làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm một thể tích bằng nhau của mỗi dung dịch mục tiêu âm tính vào hỗn hợp trên và ủ trong 40 phút. Sau đó, huỳnh quang được đo bằng bước sóng kích thích 485 nm và bước sóng phát xạ 535 nm trên đầu đọc vi mạch Tecan (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ). Các đồ thị liên kết được vẽ bằng cách sử dụng phương pháp bình phương nhỏ phi tuyến tính bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Chiến lược tuyển chọn

Chiến lược SELEX kết hợp với sắc ký ái lực đã được chứng minh là hiệu quả trong việc lựa chọn các aptamer có ái lực và tính đặc hiệu cao với phân tử mục tiêu, và đã được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu và chẩn đoán. Phương pháp này dựa trên khả năng của aptamer - các

oligonucleotide mạch đơn - có thể thay đổi cấu trúc bậc hai của chúng dưới điều kiện thích hợp để liên kết chọn lọc với phân tử đích.

Trong điều kiện không có chất mục tiêu, aptamer có xu hướng tạo thành cấu trúc bậc hai theo nguyên tắc bắt cặp Watson-Crick với các trình tự bổ sung. Tuy nhiên, khi chất mục tiêu xuất hiện, aptamer có thể chuyển sang một cấu trúc khác có ái lực cao hơn với phân tử mục tiêu, từ đó tạo thành phức hợp aptamer-mục tiêu.

Để sàng lọc các aptamer dựa trên cơ chế biến đổi cấu trúc này, nhiều phương pháp đã được phát triển tùy theo bản chất của phân tử mục tiêu. Trong hầu hết các phương pháp, aptamer sẽ tương tác với pha cố định chứa các trình tự bổ sung có khả năng lai hóa với chúng [19].

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng cột sắc ký chứa nhựa Streptavidin-agarose, trong đó, streptavidin liên kết với các oligonucleotide được đánh dấu biotin. Trình tự biotin hóa này có chứa đoạn 18-mer bổ sung với một phần của aptamer, cho phép aptamer gắn tạm thời vào pha cố định thông qua lai hóa. Sau khi loại bỏ các aptamer không liên kết bằng quá trình rửa, các phân tử mục tiêu được thêm vào với mục đích cạnh tranh ái lực. Các aptamer có khả năng chuyển đổi cấu trúc để liên kết với mục tiêu sẽ bị tách khỏi trình tự bổ sung và được rửa giải ra khỏi cột. Phân dung dịch rửa giải chứa aptamer-mục tiêu, sau đó, được thu thập, khuếch đại bằng phản ứng PCR và sử dụng làm thư viện cho các chu kỳ SELEX tiếp theo.

Trong nghiên cứu này, một thư viện ssDNA và các hợp chất khác do Nakatsuka và cộng sự báo cáo đã được sử dụng [20]. Chúng được tổng hợp bởi Công ty COSMO Tech (Hàn Quốc). Thư viện DNA và các đoạn mồi được sử dụng cho SELEX như sau:

- (1) Thư viện ssDNA gồm (79-mer):
5' GGAGGCTCTCGGGAC-GAC(N₃₆) GTCGTCCCGCCTT TAG-GATTACAG-3'
- (2) Forward primer (18-mer):
5'-GGAGGCTCTCGGGACGAC-3'
- (3) Reverse primer (25-mer): 5'-CT-GTAAATCCTAAAGGCGGGACGAC-3'
- (4) Reverse primer-Biotin (25-mer):
5'-Biotin-CTGTAAATCCTAAAGGCGGGACGAC-3'
- (5) Biotinylated column immobilizing capture (18-mer): 5' GTCGTC-CCGAGAGCCATA-BioTEG-3'

3.2. Tiến trình SELEX

Tổng cộng có 12 chu kỳ chọn lọc được thực hiện và chọn lọc loại trừ không được thực hiện cho đến chu kỳ 9. Nồng độ melamine 100 μM được sử dụng từ chu kỳ 1 đến chu kỳ 8. Bốn chu kỳ cuối cùng của quá trình chọn lọc, nồng độ melamine 1 μM được áp dụng. Ở các chu kỳ 4, 6 và 8, chúng tôi lấy mẫu để kiểm tra kết quả chọn lọc. 24 plasmid của mỗi chu kỳ đã được gửi đến Công ty COSMO để giải trình tự. Các nhóm aptamer đã được tìm thấy. Để tăng ái lực cao và tính đặc hiệu của aptamer đối với melamine, 04

chu kỳ nữa đã được thực hiện với 1 μM melamine. Tuyển chọn loại trừ cũng được áp dụng từ chu kỳ 9 cho đến 1. Sau khi biến nạp và nhân bản, 24 plasmid đã được giải trình tự và 10 nhóm đã được tìm thấy. Các lớp trình tự hàng đầu được liệt kê trong bảng 1. Trong tiến trình tuyển chọn chúng tôi thấy có nhiều trình tự có số bản sao tăng lên trong từ chu kỳ tuyển chọn, trong đó, có hai trình tự Mel01AS, Mel02AS có số bản sao đặc biệt cao lần lượt là 21 và 18 bản sao. Điều này chứng tỏ quá trình tuyển chọn đã được thực hiện và kiểm soát tốt.

Bảng 1. Số bản sao và Trình tự của 10 aptamers ứng tuyển sau 12 chu kỳ tuyển chọn

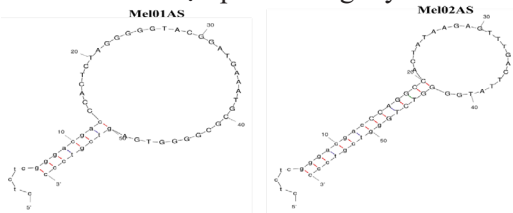
Thứ tự	Mã hiệu của trình tự	Số bản sao	Trình tự (5'→ 3')		
1	Mel01AS	21	ctctcgggac-gac	CCACTCTAGGGGGTACGGATGAAATG-CGCGGGGTGA	gtcgtccc
2	Mel02AS	18	ctctcgggac-gac	CCAGGCCACTATAAGAGTTTGACTTAT-GGGGTCTGC	gtcgtccc
3	Mel03AS	8	ctctcgggac-gac	GGGAGGGTGCCACGATTATTTTGTTCG-GCAGATGGA	gtcgtccc
4	Mel04AS	7	ctctcgggac-gac	CCGGGGAGGTTGGTTACATTCTAACT-GTCGTACGA	gtcgtccc
5	Mel05AS	6	ctctcgggac-gac	GAGTTTGGGACTGTATGTGCGTACAG-GGTCGTGCAA	gtcgtccc
6	Mel06AS	6	ctctcgggac-gac	TACAAAACAGATAGTGTGTACATGTTG-GGTTTCGTG	gtcgtccc
7	Mel07AS	5	ctctcgggac-gac	CGCTTGAAAATTAGCCTGTTGTG-GTTTTGTTTGGCA	gtcgtccc
8	Mel08AS	5	ctctcgggac-gac	ACGGGGCGCCACTAATGATGTATTGGT-GCGACAGGC	gtcgtccc
9	Mel09AS	4	ctctcgggac-gac	CACGAAACCTTCATGTACACAC-TATCTGAAAAGTA	gtcgtccc
10	Mel10AS	3	ctctcgggac-gac	TCATGTAACCTTTCTTAGGTCGGGTTG-GTAGCATTTT	gtcgtccc

3.3. Dự đoán kiểu cuộn gấp của các Aptamer

Mỗi aptamer tiềm năng thu được sau quá trình giải trình tự đều được đặt tên, trong đó, ký hiệu “Mel” biểu thị melamine,

kèm theo số thứ tự tương ứng với số lượng bản sao giảm dần. Hai trình tự có số bản sao cao nhất được chọn để phân tích cấu trúc bậc hai (2D), thông qua dự đoán cách cuộn gấp bằng máy chủ web mfold (Hình 2).

Hình 2. Cấu trúc 2D của trình tự aptamer ứng tuyển Mel01AS và Mel02AS



3.4. Tính toán ái lực của các Aptamer

Để xác định hằng số phân ly (K_d) của các aptamer thu được, chúng tôi đã sử dụng một phương pháp minh họa, được Hu và Easley phát triển. Có hai phép đo ái lực liên kết riêng biệt cho mỗi aptamer, $K_{d,eff1}$ và $K_{d,eff2}$. $K_{d,eff1}$ là hằng số phân ly giữa aptamer và trình tự DNA bắt giữ, có thể được tính bằng Phương trình (1):

$$K_{d,eff1} = \frac{[Aptamer][Capture]}{[Aptamer-Capture]} \quad (1)$$

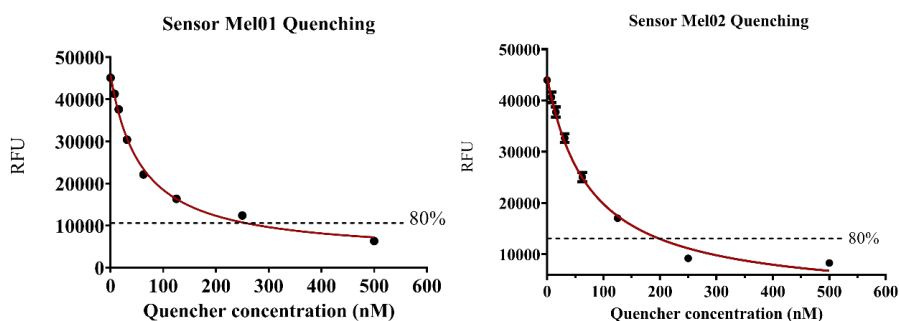
Với mục đích này, aptamer được gắn nhãn bằng fluorescein (FAM) ở đầu 5' và quencher được gắn nhãn bằng dabcyI ở đầu 3'. Khi aptamer (được sử

dụng ở 50 nM) được trộn với chất dập tắt (thay đổi trong khoảng 0 - 500 nM), cường độ huỳnh quang của dung dịch aptamer sẽ giảm. $K_{d,eff2}$ là hằng số không có đơn vị đo lường trạng thái cân bằng của quá trình chuyển đổi cấu trúc do mục tiêu gây ra, có thể được tính bằng Phương trình (2):

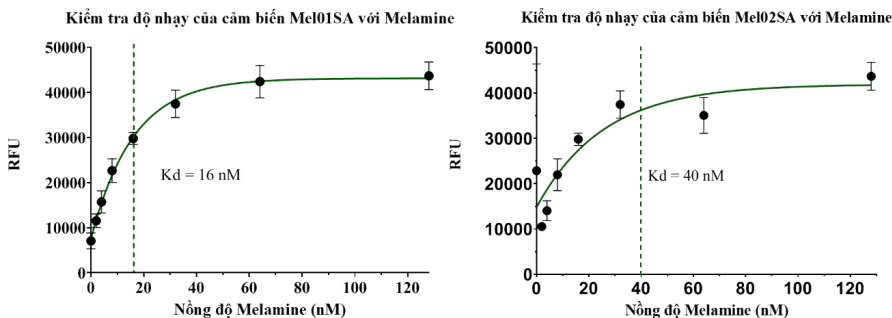
$$K_{d,eff2} = \frac{[Quenche][Aptamer-Target]}{[Aptamer-Quencher][Target]} \quad (2)$$

K_d có thể được tính bằng cách sử dụng Phương trình (3):

$$K_d = K_{d,eff1} / K_{d,eff2} \quad (3)$$



Hình 3. Kiểm tra độ dập tắt của hai aptamer sensor với chuỗi dập tắt 14 mer



Hình 4. Kiểm tra độ nhạy của hai aptamer sensor với Melamine.

Ở đây, chúng tôi đã chọn phương pháp cạnh tranh ái lực trực tiếp giữa chất đích và chuỗi bắt giữ bằng cột sắc ký ái lực và quy trình SELEX. Phương pháp này đã được nhiều tác giả công bố. Ngoài ra, chúng tôi đã cập nhật thư viện DNA được cải tiến của Nakatsuka và cộng sự để giảm thiểu những hạn chế của các phương pháp khác cũng như phương pháp này. Phương pháp này đã được chứng minh là rất phù hợp để phân lập các aptamer vì giảm đáng kể thời gian trong mỗi chu kỳ lựa chọn và các hóa chất dễ mua.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập một số DNA aptamer liên kết với melamine và kiểm tra mối quan hệ liên kết

và tính đặc hiệu của hai aptamer, Mel01AS và Mel02AS. Cả hai aptamer đều chỉ ra mối liên kết cao đối với melamine. Chiến lược chuyển đổi cấu trúc đã được chọn để thiết lập SELEX cho việc tuyển chọn aptamer. So với SELEX thông thường, chiến lược chuyển đổi cấu trúc không chỉ có lợi ích là tránh các chất mục tiêu cố định mà còn giảm thiểu các aptamer cô lập không đặc hiệu. Trong những trường hợp này, liên kết không đặc hiệu có thể xảy ra và có thể ảnh hưởng đến các ứng dụng trong tương lai khi mục tiêu không có trong dung dịch. Một chuỗi 36 nt ngẫu nhiên đã được sử dụng thay cho 30 nt để tăng khả năng tạo ra các aptamer có ái lực cao. Chỉ những trình

tự có số bản sao cao và xuất hiện lặp lại trong các chu kỳ chọn và có biểu hiện đặc hiệu với melamine mới được chọn để kiểm tra và thiết kế cảm biến huỳnh quang trong chiến lược của chúng tôi. Để đạt được độ đặc hiệu cao, bốn chất có cấu trúc tương tự như melamine đã được sử dụng trong quá trình tuyển chọn loại trừ.

Để xác định K_d , $K_{d,eff1}$, $K_{d,eff2}$, phương pháp do Hu và Easley báo cáo đã được áp dụng. Đường cong được vẽ bằng tiến trình bình phương nhỏ phi tuyến tính, phần mềm GraphPad Prism 5.0. Trong thí nghiệm của chúng tôi, để xác định hằng số $K_{d,eff1}$, chất dập tắt 13mer và 14 mer đã được sử dụng để kiểm tra khả năng dập tắt của tất cả các cảm biến thu được. Kết quả cho thấy chất dập tắt 13mer có khả năng dập tắt gấp hơn chất dập tắt 14mer. Dựa trên kết quả thu được từ thí nghiệm đối với chất dập tắt 14mer, chúng tôi quyết định chọn hai cảm biến Mel01AS và Mel02AS để tiến hành thí nghiệm xác định $K_{d,eff2}$.

Các thí nghiệm kiểm tra độ đặc hiệu cũng như độ nhạy và mức độ cạnh tranh giữa melamine và các trình tự dập tắt đã chỉ ra rằng 2 cảm biến Mel01AS và Mel02AS có độ nhạy cao với melamine với K_d lần lượt cho từng cảm biến là 16

nM và 40 nM. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu trước đây về phân lập aptamer đối với melamine, nghiên cứu của chúng tôi có một số ưu điểm đáng kể. Cụ thể, thời gian sàng lọc được rút ngắn rõ rệt, trong khi các aptamer thu được lại thể hiện ái lực cao hơn so với các báo cáo đã được công bố trước đó.

Nhờ vào độ nhạy cao giữa aptamer đã được lựa chọn trong nghiên cứu này và melamine, chúng tôi kỳ vọng có thể phát triển các hệ thử nghiệm ứng dụng trong thực tế. Phương pháp này không chỉ có tiềm năng đơn giản hóa việc phát hiện melamine trong các sản phẩm thực phẩm hằng ngày, đặc biệt là sữa, mà còn có thể trở thành công cụ hữu hiệu trong kiểm nghiệm an toàn thực phẩm.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã sàng lọc thành công hai aptamer ssDNA đặc hiệu với melamine bằng kỹ thuật SELEX trải qua 12 vòng tuyển chọn. Các aptamer này có ái lực cao (K_d lần lượt là 16 nM và 40 nM), cấu trúc ổn định và tính chọn lọc tốt. Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong việc phát triển cảm biến sinh học (aptasensor) nhằm phát hiện melamine trong thực phẩm, đặc biệt là sữa.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nhìn lại vụ bê bối sữa nhiễm độc ở Trung Quốc, Báo Nhân Dân Điện Tử. [Online]. Available: <https://nhandan.vn/nhin-lai-vu-be-boi-sua-nhiem-doc-o-trung-quoc-post594057.html>
- [2] Sữa chứa chất Melamine phát hiện và ngăn chặn thế nào, QĐND. [Online]. Available: <https://www.qdnd.vn/kinh-te/cac-van-de/sua-chua-chat-melamine-phat-hien-va-ngan-chan-the-nao-374758>
- [3] “18 loại sữa và sản phẩm sữa bị nhiễm Melamine,” VOV. [Online]. Available: <https://vov.vn/xa-hoi/18-loai-sua-va-san-pham-sua-bi-nhiem-melamine-96698.vov>
- [4] H. Uppada, J. G. S. B. R. K. and J. Panda, “A comprehensive review on melamine: Insights into risks and detection techniques,” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 84, pp. 133–140, 2024, doi:10.47583/ijpsrr.2024.v84i07.020.
- [5] M. Jalili, “A review paper on melamine in milk and dairy products,” *J. Dairy Vet. Sci.*, vol. 1, pp. 4–6, 2017, doi:10.19080/jdvs.2017.01.555566.
- [6] A. Filazi, U. T. Sireli, H. Ekici, H. Y. Can, and A. Karagoz, “Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography,” *J. Dairy Sci.*, vol. 95, pp. 602–608, 2011, doi:10.3168/jds.2011-4926.
- [7] M. Salman et al., “Identification and determination of melamine in milk by high performance liquid chromatography - UV detector,” *Der Pharma Chem.*, vol. 4, pp. 737–748, 2012.
- [8] Thermo Scientific, *Determination of melamine in milk by ion chromatography with UV detection*, 2008.
- [9] H. Xing, S. Zhan, Y. Wu, L. He, and P. Zhou, *Sensitive colorimetric detection of melamine in milk with an aptamer-modified nanogold probe*, vol. 3, 2013, ISBN: 8621342057.
- [10] H. Ping et al., “Visual detection of melamine in raw milk by label-free silver nanoparticles,” *Food Control*, vol. 23, pp. 191–197, 2012, doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.009.
- [11] K. H. Trinh et al., “Novel DNA aptameric sensors to detect the toxic insecticide

fenitrothion,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, p. 10846, 2021.

[12] K. Hong et al., “Development of novel fluorescence-based and label-free noncanonical G4-quadruplex-like DNA biosensor for facile, specific, and ultrasensitive detection of fipronil,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 427, p. 127939, 2022, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127939.

[13] M. T. Can et al., “Engineering novel aptameric fluorescent biosensors for analysis of the neurotoxic environmental contaminant insecticide diazinon from real vegetable and fruit samples,” 2022, vol. 27.

[14] K. H. Trinh et al., “Development of novel fluorescence-based and label-free noncanonical G4-quadruplex-like DNA biosensor for facile, specific, and ultrasensitive detection of fipronil,” *J. Hazard. Mater.*, p. 127939, 2021, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127939.

[15] M. Shellaiah and K. W. Sun, “Review on nanomaterial-based melamine detection,” *Chemosensors*, vol. 7, pp. 1–47, 2019, doi:10.3390/CHEMOSENSORS7010009.

[16] G. Zon, “Recent advances in aptamer applications for analytical biochemistry,” *Anal. Biochem.*, 2020, doi:10.1016/j.ab.2020.113894.

[17] H. Sun and Y. Zu, “A highlight of recent advances in aptamer technology and its application,” *Molecules*, vol. 20, pp. 11959–11980, 215AD.

[18] K. Yang, R. Pei, and M. N. Stojanovic, “In vitro selection and amplification protocols for isolation of aptameric sensors for small molecules,” *Methods*, vol. 106, pp. 58–65, 2023, doi:10.1016/j.ymeth.2016.04.032.

[19] U. Sopanrao et al., “Identification and structural analysis of novel malathion-specific DNA aptameric sensors designed for food testing,” *Biomaterials*, vol. 287, p. 121617, 2022, doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121617.

[20] N. Nakatsuka et al., “Aptamer-field-effect transistors overcome Debye length limitations for small-molecule sensing,” *Science*, vol. 362, pp. 319–324, 2018, doi:10.1126/science.aao675.