

Ứng dụng chấm lượng tử CdSe/ZnS làm chất phát huỳnh quang trong đánh dấu tế bào

Trần Thị Hồng Điệp, Nguyễn Cao Trí, Lê Khánh Thiên, Võ Thị Ngọc Thuý, Trần Văn Hiếu

Tóm tắt—Chấm lượng tử (QD) có tiềm năng làm chất đánh dấu trong nghiên cứu và hỗ trợ điều trị trong y học, nhờ những đặc tính độc đáo như ánh sáng phát xạ tùy thuộc kích thước hạt, phổ phát xạ hẹp và đối xứng, độ bền quang cao... Để ứng dụng trong sinh học, QD thường được gắn với kháng thể. Nhằm đơn giản hoá quá trình gắn, chúng tôi thử nghiệm gắn protein cầu nối cho kháng thể là protein A/G lên QD CdSe/ZnS bọc 3-mercaptopropionic acid (MPA). 80,7 % và 51,2 % protein A/G ở nồng độ tương ứng 60 µg/mL và 20 µg/mL gắn được lên QD khi tiến hành trong đệm phosphate buffer saline (PBS) mà không cần chất xúc tác N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS). Kháng thể kháng tế bào T sau khi gắn lên protein A/G có khả năng nhận diện tế bào Jurkat T. Tóm lại, protein A/G đã gắn thành công lên QD, bước đầu hỗ trợ ứng dụng QD trong đánh dấu tế bào.

Từ khóa—QD, protein A/G, kháng thể anti-pan T, tế bào Jurkat T, đánh dấu tế bào

1 MỞ ĐẦU

Các hướng nghiên cứu đa dạng trong lĩnh vực sinh học không chỉ để hiểu sự sống ở các mức độ khác nhau mà còn cung cấp thông tin hỗ trợ cho lĩnh vực y học như nghiên cứu quá trình phân phối thuốc hoặc nghiên cứu cơ chế bệnh sinh. Để tiến hành các nghiên cứu một cách hiệu quả và chính xác, các nhà khoa học cần những công cụ hỗ trợ. Một trong số những công cụ hỗ trợ đắc lực đó là công cụ đánh dấu, bao gồm đánh dấu sử dụng phóng xạ, chất màu hữu cơ, và huỳnh quang. Trong đó, đánh dấu huỳnh quang bao gồm thuốc nhuộm huỳnh quang và protein huỳnh

quang, giúp khắc phục được tính độc hại của phương pháp phóng xạ và một số nhược điểm của chất màu hữu cơ [1]. Thuốc nhuộm huỳnh quang thường được sử dụng để nghiên cứu ở mức độ tế bào do kích thước nhỏ nên không làm thay đổi hình dạng tế bào, bào quan mục tiêu. Trong khi đó, protein huỳnh quang thường dùng trong nghiên cứu biểu hiện gene bằng cách chuyển gene vào vi khuẩn hoặc tế bào sau đó biểu hiện ở dạng protein đơn hoặc dung hợp. Tuy nhiên, thuốc nhuộm và protein huỳnh quang có một số nhược điểm như kém bền quang, hiệu suất lượng tử thấp, cường độ quang thấp... gây khó khăn khi đánh dấu trong thời gian dài hoặc đánh dấu những mẫu có độ dày lớn [2]. Vì thế cần có phương pháp đánh dấu hiệu quả hơn để sử dụng cho những nghiên cứu đặc thù.

Một phương pháp đánh dấu mới được nghiên cứu và phát triển trong thời gian gần đây là sử dụng các hạt nano. Trong số những hạt nano, chấm lượng tử (quantum dot/QD) có nhiều ưu điểm và tiềm năng ứng dụng, như có thể điều chỉnh ánh sáng phát xạ nhờ thay đổi kích thước hay cấu tạo lõi, phổ phát xạ hẹp và đối xứng, phổ hấp thụ rộng, tính bền quang cao, hiệu suất lượng tử cao, cường độ quang cao...[3]. Để có thể dùng làm chất đánh dấu, QD cần gắn với một số phân tử như peptide, protein, oligonucleotide, kháng thể... Trong đó, kháng thể được sử dụng rộng rãi hơn cả cho mục tiêu nhận diện sinh học. Kháng thể được gắn với QD bằng nhiều cách khác nhau, như thông qua tương tác streptavidin-biotin, liên kết cộng hóa trị hoặc tương tác tĩnh điện. Một phương pháp hữu hiệu hơn đó là sử dụng protein cầu nối, đặc biệt là protein A, protein G hoặc protein A/G. Trên thế giới, có một số nghiên cứu sử dụng protein A/G làm protein cầu nối để gắn kháng thể lên QD thương mại nhằm ứng dụng trong đánh dấu [4]. Ở Việt Nam dù đã có nhiều

Ngày nhận bản thảo: 05-01-2018; Ngày chấp nhận đăng: 20-02-2018; Ngày đăng: 31-12-2018.

Trần Thị Hồng Điệp, Nguyễn Cao Trí, Lê Khánh Thiên, Võ Thị Ngọc Thuý, Trần Văn Hiếu* – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

*Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

phòng thí nghiệm tạo được QD nhưng chưa có công bố nào giúp ứng dụng chúng làm chất đánh dấu trong thực tế [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành gắn định hướng kháng thể kháng tế bào Jurkat T lên bề mặt QD CdSe/ZnS thông qua protein cầu nối là protein A/G, và thử nghiệm khả năng đánh dấu tế bào Jurkat T của QD này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Khảo sát điều kiện tối ưu để gắn protein lên chấm lượng tử

BSA được gắn lên chấm lượng tử CdSe/ZnS bọc MPA (được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bộ môn Vật lý ứng dụng, Khoa Vật lý - Vật lý kỹ thuật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh) trong điều kiện có và không có EDC/NHS. Mỗi điều kiện được khảo sát với ba hệ đệm, mỗi hệ đệm bao gồm đệm hoạt hoá và đệm gắn theo thứ tự: MES 0,01 M pH 6 - MES 0,01 M pH 6; MES 0,01 M pH 6 - NaP 0,01 M pH 7,4 và MES 0,01 M pH 6 - PBS 1X pH 7,4.

Quy trình gắn bao gồm ủ và đảo 0,25 mg QD với 99 μ L đệm hoạt hoá, 8 μ L EDC 0,2 M, 18 μ L NHS 0,2 M ở nhiệt độ phòng 30 phút. Dừng phản ứng bằng 8 μ L 2-mercaptoethanol, để ở nhiệt độ phòng 5 phút. Rửa hạt với đệm hoạt hoá hai lần bằng cách li tâm ở 10000 vòng/phút trong 3 phút, bỏ dịch nổi. Thêm 215 μ L đệm gắn, 25 μ L NaCl 3 M, 10 μ L BSA (7 mg/mL). Đảo ở 10 °C trong 2,5 giờ. Dừng phản ứng bằng 15 μ L Tris 0,05 M pH 8. Li tâm, thu dịch nổi để định lượng lượng BSA chưa gắn bằng phương pháp Bradford với dung dịch Bradford ở 595 nm. Tính hiệu suất gắn theo công thức: (lượng protein ban đầu – lượng protein không gắn)/(lượng protein ban đầu) \times 100 %. Hạt sau khi gắn BSA được kiểm tra bằng phương pháp chạy điện di trên gel agarose 0,5 %, chụp phổ FT-IR, UV-Vis, và Photoluminescence (PL).

Kiểm tra độ bền liên kết giữa QD và protein

BSA được gắn lên QD trong đệm PBS 1X pH 7,4 không có EDC/NHS. Ủ qua đêm sản phẩm sau khi gắn với ure 8 M ở giá trị pH 3, 7, 9. Chụp phổ FT-IR sản phẩm sau khi ủ để xác nhận sự tồn tại của liên kết giữa QD và protein. Tương tự, protein GFP được gắn lên QD trong đệm PBS 1X pH 7,4

không có EDC/NHS. Ủ qua đêm sản phẩm sau khi gắn với ure 8 M ở giá trị pH 3, 7, 9. Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 60X với ánh sáng kích thích có bước sóng 480 nm để xác định cường độ sáng cùng sự tồn tại liên kết giữa GFP với QD thông qua sự đồng hiện diện tín hiệu huỳnh quang của QD và GFP.

Khảo sát hiệu suất gắn ở các nồng độ protein khác nhau

BSA được gắn ở các nồng độ phản ứng 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL lên QD trong đệm PBS 1X pH 7,4 không có EDC/NHS. Định lượng BSA dư bằng Bradford ở 595 nm và tính hiệu suất gắn. Tương tự, protein A/G được gắn lên QD ở hai nồng độ phản ứng 20 và 60 μ g/mL trong đệm PBS 1X pH 7,4, không có EDC/NHS. Định lượng protein A/G dư bằng Bradford ở 595 nm, tính hiệu suất gắn.

Kháng thể được gắn lên chấm lượng tử-protein A/G (QD-pA/G) sau khi QD-pA/G đã được đảo với BSA 5 % trong 2 tiếng ở 10 °C để đảm bảo giữa QD và tế bào không có sự tương tác trực tiếp bằng các liên kết không đặc hiệu. Bổ sung kháng thể thỏ kháng tế bào Jurkat T [6] với tỉ lệ theo khối lượng kháng thể:protein A/G đã gắn 3:1. Phản ứng được tiến hành trong dịch ủ kháng thể (Tris-base 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2) và đảo ở 10 °C trong 2,5 tiếng. Li tâm, thu dịch nổi để định lượng kháng thể chưa gắn bằng Bradford ở 595 nm và tính hiệu suất gắn kháng thể.

Kiểm tra khả năng đánh dấu tế bào của QD-pA/G-kháng thể anti-pan T

Đảo 0,005 mg QD-pA/G-kháng thể với 10^6 tế bào Jurkat T trong môi trường nuôi tế bào (RPMI 1640 10 % FBS) với thể tích phản ứng là 250 μ L, ở 10 °C trong 30 phút. Li tâm, bỏ dịch nổi, hoà cấy tế bào bằng 50 μ L môi trường nuôi tế bào. Quan sát kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 40X với ánh sáng kích thích có bước sóng 480 nm.

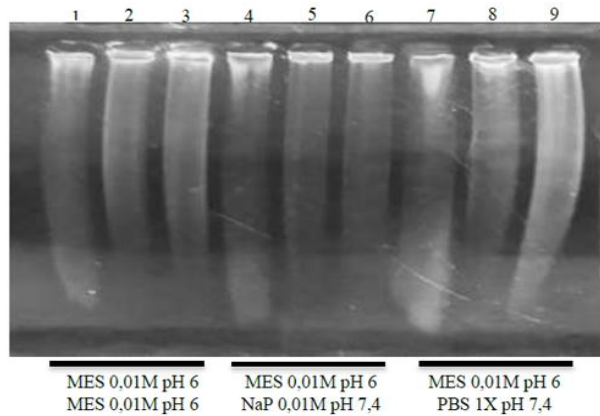
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát điều kiện tối ưu để gắn protein lên QD

Kết quả chạy điện di QD sau khi gắn BSA như trong Hình 1. Ở ba hệ đệm, QD gắn BSA khi có

(giếng 3, 6, 9) và không có EDC/NHS (giếng 2, 5, 8) di chuyển chậm hơn QD không gắn BSA (giếng 1, 4, 7). Do BSA gắn lên QD làm tăng kích thước và cản trở sự di chuyển của hạt qua các lỗ gel. Đồng thời, việc hình thành liên kết amide giữa gốc $-NH_2$ của BSA với gốc $-COOH$ trên QD làm giảm một phần điện tích của QD khiến tốc độ di chuyển chậm hơn. Chứng tỏ ở ba hệ đệm, trong

trường hợp có và không có EDC/NHS, protein đều gắn được lên chấm lượng tử. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Xuewen Hue khi gắn thành công BSA lên QD mà không có EDC/NHS và trong công trình của Kathryn L. Gilroy khi gắn protein A/G lên QD có EDC/NHS [4, 7].

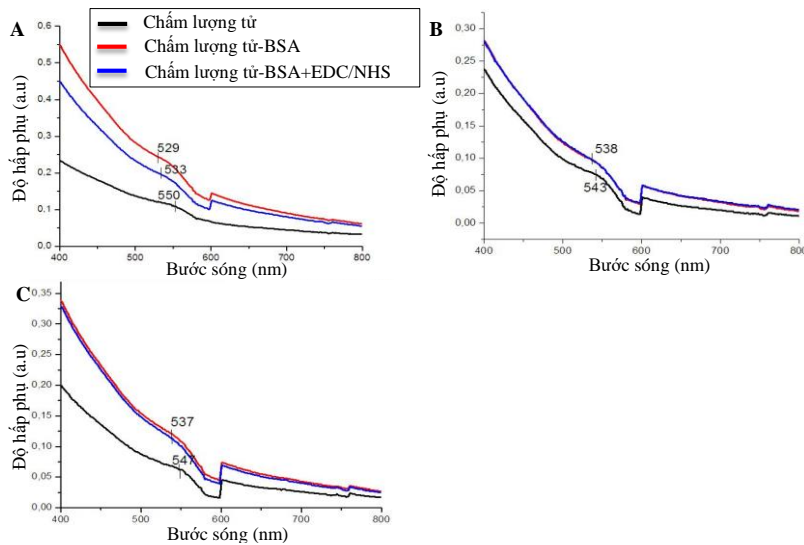


Hình 1. Phân tích sản phẩm gắn giữa QD với BSA trên gel agarose.

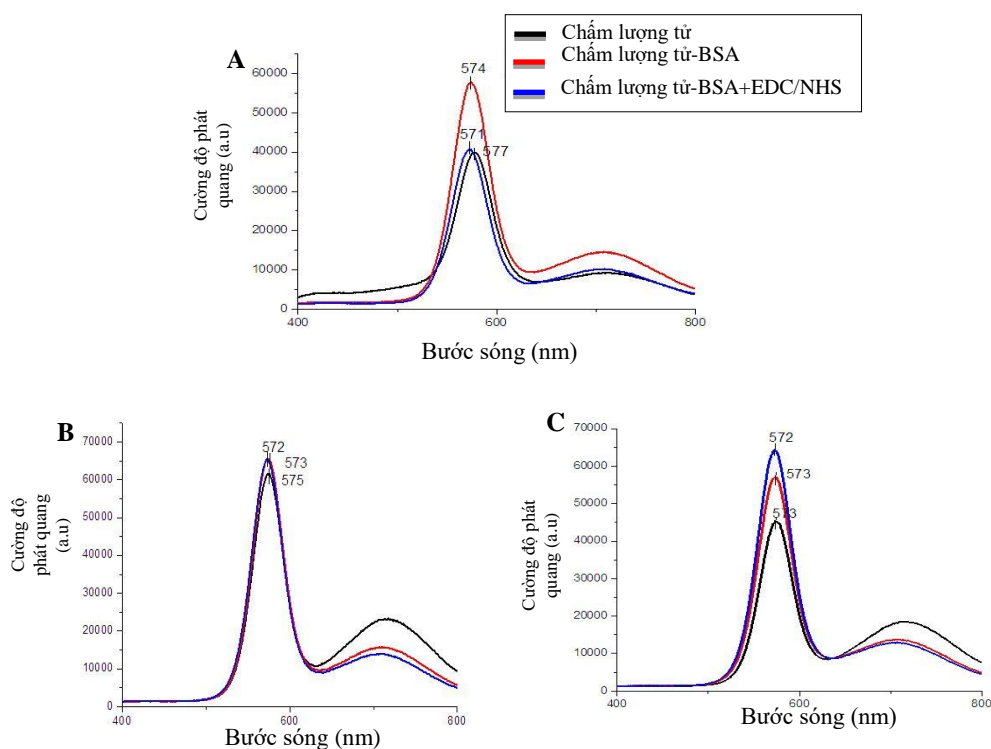
Chú thích: 1, 4, 7: QD; 2, 5, 8: QD-BSA; 3, 6, 9: QD-BSA có EDC/NHS

Kết quả chụp phổ UV-Vis thu được như trong Hình 2. Đỉnh phổ hấp phụ của QD CdSe/ZnS/MPA là 550 nm (MES-MES), 543 nm (MES-NaP) và 547 nm (MES-PBS). Sau khi gắn BSA, bước sóng hấp phụ trở nên ngắn hơn: 529-533 nm (MES-MES), 538 nm (MES-NaP), 537 nm (MES-PBS). Do kích thước phân tử của BSA

nhỏ hơn MPA nên đỉnh hấp phụ của QD-BSA bị dịch về phía bước sóng ngắn hơn so với hạt CdSe/ZnS/MPA. Bên cạnh đó, đỉnh hấp phụ của QD-BSA trong hai trường hợp có và không có EDC/NHS tương đương nhau. Chứng tỏ ở cả ba hệ đệm BSA gắn được lên QD trong cả trường hợp có và không có EDC/NHS.



Hình 2. Phân tích kết quả gắn BSA lên QD bằng phổ UV-Vis trong hệ đệm MES-MES (A), MES-NaP (B), MES-PBS (C)



Hình 3. Phân tích kết quả gắn BSA lên QD bằng phổ PL trong hệ đệm MES-MES (A), MES-NaP (B), MES-PBS (C)

Bảng 1. Hiệu suất gắn BSA lên QD ở các hệ đệm khác nhau.

Đệm hoạt hóa	MES 0,01 M pH 6		MES 0,01 M pH 6		MES 0,01 M pH 6	
Đệm gắn	MES 0,01 M pH 6		NaP 0,01 M pH 7,4		PBS 1X pH 7,4	
EDC/NHS	Không	Có	Không	Có	Không	Có
Hiệu suất (%)	54,3 ^a	54,0 ^{a,d}	50,5 ^b	50,0 ^{b,d}	58,9 ^c	56,8 ^c

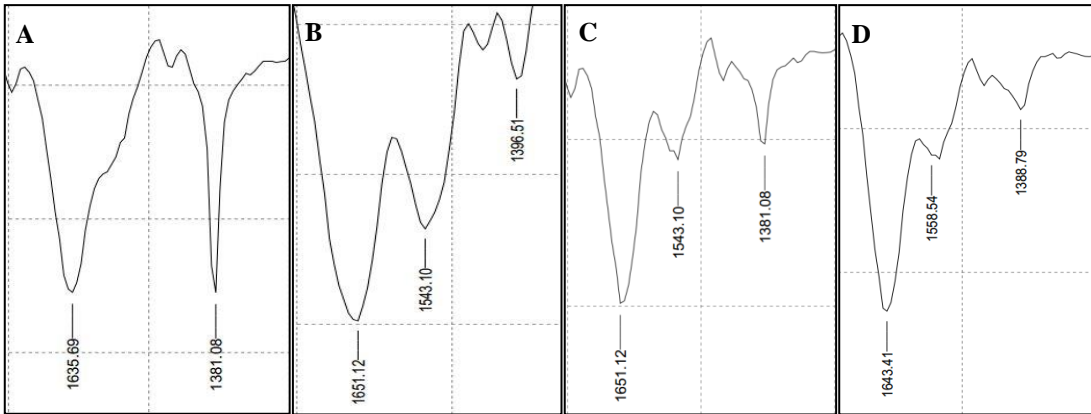
Chú thích: a, b, c, d: khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$

Kết quả chụp phổ PL được thể hiện trong Hình 3. Trong cả ba hệ đệm, bước sóng phát xạ trước và sau khi gắn BSA không dịch chuyển nhiều (dao động trong khoảng 571-577 nm). Chứng tỏ việc gắn BSA không làm thay đổi đáng kể kích thước hạt. Bên cạnh đó, cường độ phát quang tương đối ổn định và có xu hướng tăng sau khi gắn BSA, đặc biệt trong hệ đệm MES-PBS và MES-MES. Điều này cho thấy việc gắn BSA không gây ảnh hưởng đến đặc tính của QD, mặt khác còn giúp tăng khả năng bảo vệ lõi, tăng cường độ phát quang.

Trong ba hệ đệm, hiệu suất gắn BSA khi có và không có EDC/NHS là như nhau, hệ đệm MES-

PBS cho hiệu suất gắn cao nhất, đặc biệt khi ở điều kiện không có EDC/NHS (Bảng 1).

Mặt khác, khi không sử dụng EDC/NHS thì bước hoạt hóa là không cần thiết. Bên cạnh đó, hiệu suất gắn không thay đổi khi chỉ sử dụng đệm PBS thay vì sử dụng hệ đệm MES-PBS. Do đó, BSA được gắn trong đệm PBS 1X pH 7,4, kết quả chụp phổ FT-IR thu được như trong Hình 4. Khi so sánh với đối chứng là QD (Hình 4 A) và BSA (Hình 4 B) trong khoảng 1000–2000 cm^{-1} , QD gắn BSA trong cả trường hợp có và không có EDC/NHS đều có phổ đặc trưng với ba đỉnh ở số sóng khoảng 1380, 1540, 1650 cm^{-1} (Hình 4 C, D).



Hình 4. Phân tích kết quả gắn BSA lên QD trong đệm PBS 1X pH 7,4 bằng phổ FT-IR.

Chú thích: A: QD; B: BSA; C: QD-BSA; D: QD-BSA có EDC/NHS.

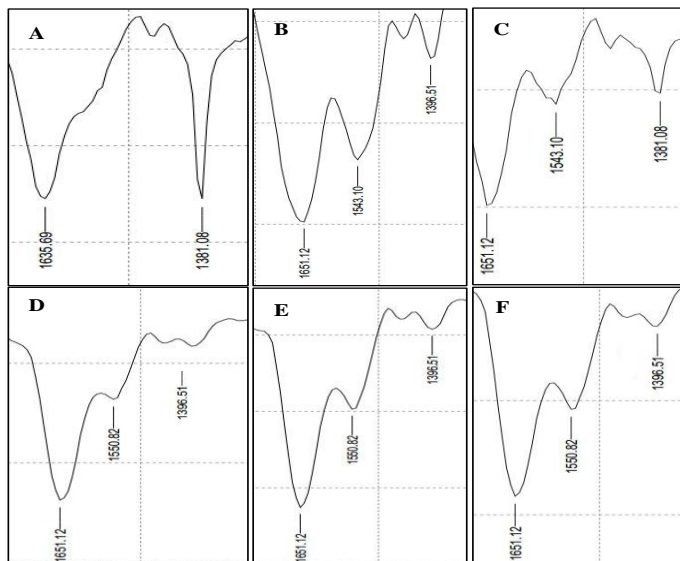
Các kết quả trên cho thấy protein gắn được lên QD đạt hiệu suất cao nhất khi tiến hành trong đệm PBS 1X pH 7,4 và không cần sự hỗ trợ của EDC/NHS.

Kiểm tra độ bền liên kết giữa QD và protein

Do BSA gắn lên QD mà không cần xúc tác bởi EDC/NHS nên đặt ra giả thiết liên kết giữa QD và protein không phải là một liên kết cộng hoá trị, tức có thể là liên kết ion. Để kiểm tra giả thiết, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm kiểm tra độ bền của liên kết này.

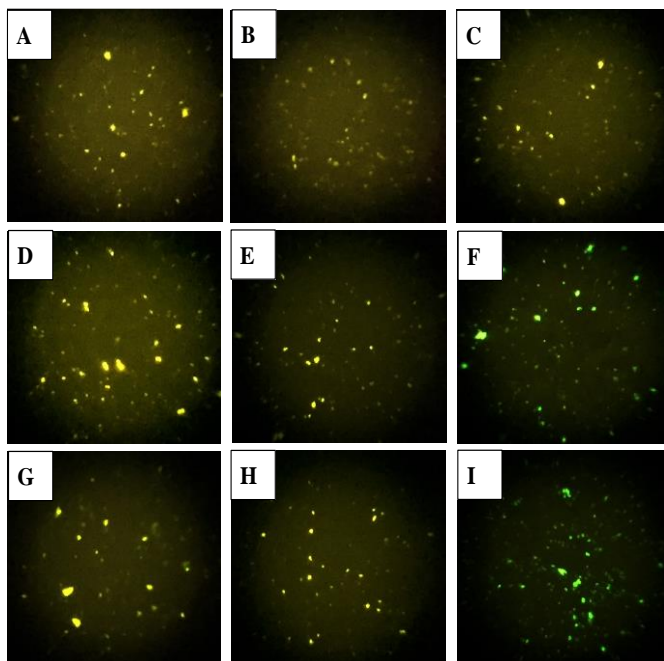
Kết quả chụp phổ FT-IR của những mẫu đã gắn với BSA đều có những đỉnh đặc trưng và khác với phổ của các mẫu đối chứng (Hình 5). Bên cạnh đó, trong cả ba trường hợp QD-BSA được xử lý với ure (Hình 5 E, F, G), phổ thu được tương tự như phổ của mẫu QD-BSA không được xử lý (Hình 5 D). Kết quả này chứng tỏ liên kết giữa QD và BSA là liên kết bền dưới tác động của ure 8 M ở các giá trị pH 3, 7, 9.

Kết quả quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang QD-GFP sau khi xử lý với ure 8 M ở các giá trị pH khác nhau thu được như trong Hình 6.



Hình 5. Kiểm tra liên kết giữa QD và BSA dưới tác động của ure 8 M pH 3, 7, 9 bằng phổ FT-IR.

Chú thích: A: QD; B: BSA; C: QD-BSA; D: QD-BSA, ure pH 3; E: QD-BSA, ure pH 7; F: QD-BSA, ure pH 9



Hình 6. Xác định độ bền liên kết giữa QD và protein dưới tác động của ure 8 M ở các giá trị pH 3 (A, B, C), pH 7 (D, E, F), và pH 9 (G, H, I) dưới kính hiển vi huỳnh quang.
Chú thích: A, D, G: QD; B, E, H: QD-BSA; C, F, I: QD-GFP. Độ phóng đại 60X, bước sóng kích thích 480 nm. Ảnh đại diện cho 3 lần lặp lại độc lập

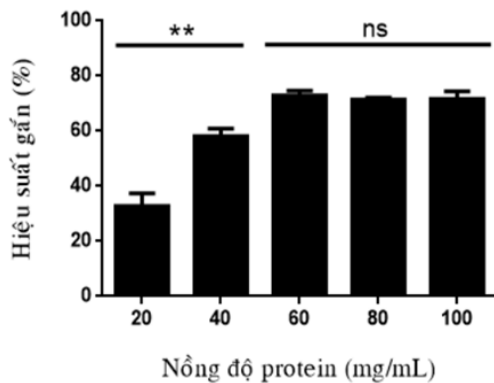
Ở Hình 6 A, B, C, sau khi xử lý với ure 8 M pH 3, độ sáng của QD giảm rõ rệt. Ở pH 7 và 9 (Hình 6 D, E, F, G, H, I), độ sáng của QD không bị ảnh hưởng. Do cường độ huỳnh quang của QD phụ thuộc rất nhiều vào giá trị pH. Ở pH thấp, lớp vỏ bọc của QD bị hư hại gây giảm khả năng bảo vệ lõi, làm cường độ sáng giảm hơn 80 % [8]. Ở nghiên cứu khác, cường độ sáng của QD bọc bởi MPA ổn định nhất tại pH 7,4, ở pH <6 QD ZnSe/ZnS bọc MPA có nguy cơ bị tắt quang [9]. Riêng ở Hình 6 C, dưới tác động của pH 3, huỳnh quang màu xanh GFP trong mẫu không xác định được là có hay không. Do khả năng phát huỳnh quang của GFP chỉ ổn định ở pH 6-10, ở pH <6 cường độ huỳnh quang giảm mạnh [10]. Ở Hình 6 F và I, dễ dàng nhận ra màu xanh của GFP. Chứng tỏ rằng, GFP vẫn gắn với QD sau khi xử lý với ure 8 M ở pH 7 và 9.

Các kết quả trên chứng tỏ rằng tuy không sử dụng EDC/NHS, liên kết bền giữa QD và protein vẫn được tạo thành. Liên kết này bền dưới tác động của ure là chất gây phá vỡ các liên kết không cộng hóa trị và bền ở các điều pH khác nhau.

Khảo sát hiệu suất gắn ở các nồng độ protein khác nhau

Hiệu suất gắn tương ứng với BSA ở các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt là 33,5; 57,8; 73,2; 71,4; 71,7 %. Đồ thị so sánh hiệu suất tương ứng với các nồng độ BSA khác nhau được thể hiện trong Hình 7. Hiệu suất tăng dần khi nồng độ tăng từ 20 $\mu\text{g/mL}$ lên 40 $\mu\text{g/mL}$ và 60 $\mu\text{g/mL}$. Nhưng khi tăng từ 60 $\mu\text{g/mL}$ lên 80 $\mu\text{g/mL}$ và 100 $\mu\text{g/mL}$, hiệu suất không thay đổi. Nguyên nhân có thể là do khi tăng nồng độ BSA phản ứng, mật độ phân tử BSA tăng, làm tăng khả năng tiếp xúc giữa các phân tử BSA và QD giúp hiệu suất gắn tăng. Khi mật độ BSA tăng đến một mức nhất định trong khi lượng hạt cố định thì xác suất tương tác giữa QD và BSA được giữ ổn định.

Với mục tiêu gắn một phân tử protein lên một QD, lượng protein sử dụng phải ở mức thấp nhất. Vì thế, trong nhóm hiệu suất có sự khác biệt và nhóm không có sự khác biệt chúng tôi lựa chọn nồng độ protein thấp nhất ở mỗi nhóm tương ứng là 20 $\mu\text{g/mL}$ và 60 $\mu\text{g/mL}$ để áp dụng cho protein A/G.



Hình 7. Hiệu suất gắn BSA lên QD ở các nồng độ khác nhau
 Chú thích: **: $p < 0.01$, ns: không có khác biệt về mặt thống kê

Hiệu suất trung bình khi gắn protein A/G ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ và 60 $\mu\text{g/mL}$ lên QD tương ứng là 51,2 % và 80,7 %. Hiệu suất này có phần cao hơn hiệu suất gắn BSA lên QD. Nguyên nhân có thể do kích thước của protein A/G (50,5 kDa) nhỏ hơn BSA (66,5 kDa) nên mật độ phân tử của protein A/G cao hơn BSA khi cùng nồng độ khối lượng/thể tích. Dẫn đến xác suất tương tác giữa QD và protein A/G tăng và tăng hiệu suất gắn. Đồng thời, cũng do kích thước nhỏ hơn nên protein A/G ít gây cản trở không gian, nên một QD có thể gắn nhiều phân tử protein A/G hơn so với khi gắn BSA. Như vậy, ở hai nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ và 60 $\mu\text{g/mL}$ protein A/G đều gắn hiệu quả lên QD. Tuy nhiên, với mong muốn gắn một kháng thể lên một QD nhằm hạn chế hiện tượng kết cụm tế bào khi ứng dụng trong đánh dấu. Đồng thời, gắn một kháng thể lên một QD giúp thu được cường độ tín hiệu huỳnh quang lớn hơn

so với gắn nhiều kháng thể lên cùng một QD. Vì thế, để giới hạn lượng kháng thể bám lên một QD, nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ protein A/G được lựa chọn để tiến hành cho các thí nghiệm tiếp theo.

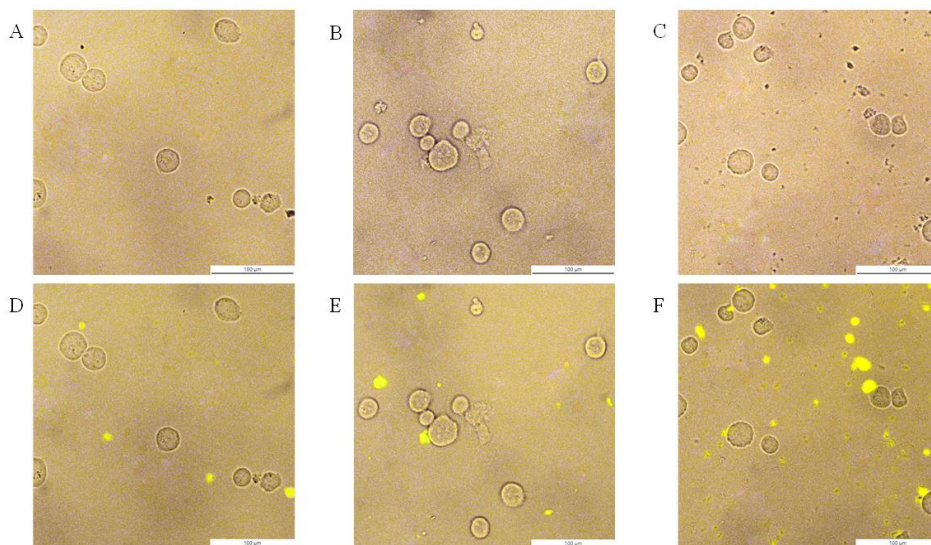
Hiệu suất gắn kháng thể lên QD khi không có protein A/G trung bình chỉ đạt 9,4 %. Tuy nhiên, hiệu suất tăng đáng kể, trung bình đạt 24,8 %, khi gắn kháng thể lên QD thông qua protein A/G (Bảng 2). Chứng tỏ rằng, protein A/G giúp tăng hiệu quả gắn kháng thể lên chấm lượng tử.

Bảng 2. Hiệu suất gắn kháng thể lên QD khi có và không có protein A/G

Lần	QD-kháng thể			QD-pA/G-kháng thể		
	1	2	3	1	2	3
Hiệu suất (%)	8,2	10,3	9,7	23,8	37,1	14,0

Kiểm tra khả năng đánh dấu tế bào của QD-pA/G-kháng thể anti panT

Với mật độ 8–10 tế bào/vùng thị trường, QD gắn trực tiếp kháng thể (Hình 8 B, E) chỉ bắt được trung bình một tế bào. Trong khi đó, QD gắn với kháng thể thông qua protein A/G (Hình 8 C, F) bắt được trung bình năm tế bào. Nguyên nhân là do lượng kháng thể gắn trực tiếp lên QD thấp hơn gắn thông qua protein A/G. Hơn nữa, khi gắn trực tiếp, kháng thể được gắn không định hướng. Trong khi với sự hỗ trợ của protein A/G, kháng thể được gắn với vùng Fab quay ra ngoài, làm tăng hiệu quả bắt tế bào.



Hình 8. Kiểm tra khả năng bắt tế bào Jurkat T của kháng thể anti-pan T gắn trên QD ở ánh sáng trắng (A, B, C) và ánh sáng huỳnh quang (D, E, F).

Chú thích: A, D: QD; B, E: QD-kháng thể; C, F: QD-pA/G-kháng thể. Độ phóng đại 40X, bước sóng kích thích 480 nm. Ảnh đại diện cho 3 lần lặp lại độc lập.

Những kết quả trên cho thấy rằng, QD gắn với kháng thể thông qua protein A/G có khả năng bắt lên tế bào Jurkat T hiệu quả hơn QD gắn trực tiếp với kháng thể.

4 KẾT LUẬN

Protein đã được gắn thành công lên QD trong đệm PBS 1X pH 7,4 và không cần sự hoạt hóa của EDC/NHS, thông qua một tương tác bền với ure 8 M ở các điều kiện pH 3, 7, và 9. Việc gắn kháng thể anti-pan T lên QD thông qua protein A/G giúp QD-pA/G-kháng thể có khả năng bắt lên tế bào Jurkat T hiệu quả hơn so với việc gắn trực tiếp kháng thể lên QD. Như vậy, chúng tôi đã tạo ra được phức hợp QD-pA/G-kháng thể nhằm bước đầu ứng dụng QD CdSe/ZnS làm chất phát huỳnh quang trong ứng dụng đánh dấu tế bào.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài 105/2017/HĐ-SKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. A.R. Santos *et al.*, "The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture, *J. Nanobiotechnology*", vol. 8, no. 1, pp. 24, 2010.
[2]. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, "Quantum dots versus organic dyes

as fluorescent labels", *Nat. Methods*, vol. 5, no. 9, pp.763–775, 2008.
[3]. A.M. Smith, X. Gao, S. Nie, Quantum dot nanocrystals for *in vivo* molecular and cellular imaging, *Photochem Photobiol*, vol. 80, no. 3, pp. 377–385, 2004.
[4]. K.L. Gilroy, S.A. Cumming, A.R. Pitt, A simple, sensitive and selective quantum-dot-based western blot method for the simultaneous detection of multiple targets from cell lysates, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 547–554, 2010.
[5]. T.K. Anh, "Nghiên cứu xây dựng công nghệ chế tạo và ứng dụng của vật liệu nano phát quang và vật liệu quang điện polyme dẫn lai hạt kim loại nano". [Online]. Available:<http://www.vast.ac.vn/component/detail/?view=detail&id=26&cid=43>. [Accessed: 27-Dec-2017].
[6]. T.M. Thượng *et al.*, "Tạo và thu nhận chọn lọc kháng thể IgG kháng protein màng của tế bào Jurkat T", *Sci. Technol. Dev.*, 19, pp. 26–35, 2016.
[7]. X. He, L. Gao, N. Ma, "One-step instant synthesis of protein-conjugated quantum dots at room temperature". *Sci. Rep.*, 3, pp. 2825, 2013.
[8]. V. Kulvietis, G. Streckyte, R. Rotomskis, "Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media", *Lith. J. Phys.*, vol. 51, no. 2, pp. 163–171, 2011.
[9]. J. Ke, X. Li, Y. Shi, Q. Zhao, X. Jiang, "A facile and highly sensitive probe for Hg(II) based on metal-induced aggregation of ZnSe/ZnS quantum dots", *Nanoscale*, vol. 4, no. 16, pp. 4996, 2012.
[10]. T.N. Campbell, F.Y.M. Choy, "The effect of pH on green fluorescent protein: a brief review further reading", *Mol. Biol. Today*, 2, pp. 1–4, 2001.

Application of quantum dots as fluorescent maker in cell labeling

Hong Diep Thi Tran, Cao Tri Nguyen, Khanh Thien Le, Ngoc Thuy Thi Vo, Hieu Van Tran*

VNUHCM-University of Science

*Corresponding author: tvhieu@hcmus.edu.vn

Received: 01-05-2018; Accepted: 20-02-2018; Published: 31-12-2018

Abstract—Quantum dots (QDs) have the potential to be used as a marker in research and supporting for medical treatment because of their unique optical and electronic properties such as size-tuneable light emission, narrow emission, high photostability, etc. With the goal of applying for biomarkers, QDs are often attached with antibodies. In order to simplify the binding process, we experimented to attach adaptor protein, namely protein A/G to CdSe/ZnS QDs covered by 3-mercaptopropionic acid (MPA).

80.7 % and 51.2 % of protein A/G at the concentration of 60 µg/mL and 20 µg/mL, respectively, conjugated with QDs in phosphate buffer saline (PBS) without supporting of *N*-Ethyl-*N'*-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS). After attaching to protein A/G, anti-pan T antibody could recognize and visualize Jurkat T cells. In conclusion, protein A/G was conjugated successfully on QDs and initially support for application in cell labeling.

Keywords—Quantum dots, protein A/G, anti-pan T antibody, Jurkat T cells, cell labeling