

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

HUỲNH THỊ THUỶ LINH

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN
TẠI CHỖ BỆNH ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT
TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ
KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG

Hà Nội - 2026

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

HUỲNH THỊ THUỶ LINH

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN
TẠI CHỖ BỆNH ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT TRÊN
TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

Ngành đào tạo: Kỹ thuật điện tử
Mã số: 9520203

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ
KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG

NGHIÊN CỨU SINH

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

Huỳnh Thị Thuỷ Linh GS.TS. Chữ Đức Trình PGS.TS. Cao Việt Hùng

XÁC NHẬN CỦA ĐƠN VỊ ĐÀO TẠO

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng các kết quả trình bày trong luận án là công trình nghiên cứu của tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của GS.TS. Chử Đức Trình và PGS.TS. Cao Việt Hùng. Các số liệu, kết quả nghiên cứu và đóng góp khoa học chính trong luận án là trung thực, đã được công bố, xuất bản trong các bài báo khoa học của tôi cùng các cộng sự. Những kết quả này chưa từng được sử dụng để bảo vệ bất kỳ luận án nào trước đây. Các tài liệu tham khảo đều được trích dẫn đầy đủ và đúng quy định.

Đại diện tập thể cán bộ hướng dẫn

Hà Nội, ngày 21 tháng 6 năm 2026
Tác giả luận án

GS.TS. Chử Đức Trình

Huỳnh Thị Thuỳ Linh

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận án, tôi đã nhận được sự hỗ trợ quý báu từ nhiều cá nhân và tập thể.

Trước hết, tôi xin trân trọng gửi lời tri ân sâu sắc đến GS.TS. Chủ Đức Trình, trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc Gia Hà Nội, và PGS.TS. Cao Việt Hùng, trường Kỹ thuật Samueli, Đại học California, Mỹ. Sự hướng dẫn tận tâm, những trao đổi học thuật cùng các góp ý chuyên môn của quý thầy đã giúp tôi định hướng nghiên cứu và từng bước hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn quý thầy cô, cán bộ, học viên, sinh viên các phòng thí nghiệm Bộ môn Vi cơ điện tử và Vi hệ thống, Khoa Điện tử – Viễn thông, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội; phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế; phòng thí nghiệm Kỹ thuật Y sinh, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam – Hàn Quốc; phòng thí nghiệm Hệ thống y sinh, Khoa Cơ khí, Trường Kỹ thuật, Đại học Quốc gia Trung Chính, Đài Loan. Sự hợp tác và hỗ trợ của các đơn vị đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực nghiệm và thu thập dữ liệu nghiên cứu.

Tôi cũng xin cảm ơn tập thể quý thầy cô Khoa Điện tử Viễn thông, trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội; quý đồng nghiệp Khoa Kỹ thuật và Công nghệ – Đại học Huế đã chia sẻ kinh nghiệm chuyên môn, đóng góp nhiều ý kiến hữu ích và luôn hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Sau cùng, tôi xin gửi lời tri ân tới gia đình, những người luôn là điểm tựa tinh thần vững chắc, đã động viên, sẻ chia và đồng hành cùng tôi trong suốt chặng đường học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 21 tháng 6 năm 2026

Tác giả luận án

Huỳnh Thị Thuỳ Linh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	xi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	xii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	xxi
MỞ ĐẦU	1
1. Sự cần thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	3
4. Phương pháp nghiên cứu.....	3
5. Các kết quả nghiên cứu thu được.....	4
6. Bố cục của luận án	5
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH TÔM ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT WSSV VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN	9
1.1. Bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV	10
1.1.1. Bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV và tác động đến ngành nuôi tôm	10
1.1.1.1. Tình hình bệnh WSSV trên thế giới.....	10
1.1.1.2. Tình hình bệnh WSSV ở Việt Nam.....	12
1.1.2. Cấu trúc vi-rút WSSV và chỉ dấu đặc trưng-protein VP28.....	17
1.1.2.1. Cấu trúc vi-rút WSSV	17
1.1.2.2. Protein VP28	18

1.2. Các phương pháp phát hiện WSSV hiện nay	19
1.2.1. Phương pháp truyền thống	21
1.2.1.1. Chẩn đoán lâm sàng	21
1.2.1.2. Phương pháp mô bệnh học	22
1.2.1.3. Phương pháp kính hiển vi điện tử TEM	23
1.2.1.4. Phương pháp lai tại chỗ ISH	23
1.2.2. Phương pháp PCR	25
1.2.3. Phương pháp miễn dịch học	25
1.2.3.1. Phương pháp ELISA	25
1.2.3.2. Phương pháp Western Blot	26
1.2.3.3. Phương pháp FTA	27
1.2.3.4. Phương pháp test nhanh miễn dịch sắc ký ICTS	28
1.2.4. Phương pháp cảm biến sinh học điện hoá	28
1.2.4.1. Cảm biến sinh học	29
1.2.4.2. Cảm biến sinh học điện hóa	31
1.2.4.3. Phân loại cảm biến sinh học điện hóa	33
1.3. Các nghiên cứu trong và ngoài nước về phát hiện WSSV	37
1.3.1. Nghiên cứu trong nước	37
1.3.2. Nghiên cứu trên thế giới	38
1.4. Đề xuất hệ thống thiết bị chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV	41
1.4.1. Cơ sở và định hướng phát triển hệ thống thiết bị	41
1.4.2. Cấu trúc và nguyên lý hoạt động	43

1.4.3. Ưu điểm và tiềm năng ứng dụng	44
Kết luận chương	45
CHƯƠNG 2. CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ NGUYÊN LÝ PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ ĐIỆN HOÁ PHÁT HIỆN WSSV.....	46
2.1. Chức năng hoá điện cực	46
2.1.1. Đầu thu sinh học.....	48
2.1.2. Đơn lớp tự lắp ráp SAM.....	51
2.1.3. Các hạt vàng nano AuNPs.....	55
2.2. Bộ phận chuyển đổi tín hiệu.....	57
2.3. Phương pháp điện hóa.....	57
2.3.1. Quét thế tuần hoàn CV (Cyclic Voltammetry)	58
2.3.2. Vôn-ampe sóng vuông SWV (Square Wave Voltammetry)	61
2.3.3. Phổ tổng trở điện hóa EIS	62
2.3.3.1. Mô hình mạch điện tương đương Randles	62
2.3.3.2. Biểu diễn phổ tổng trở trong mặt phẳng phức	64
2.4. Nguyên lý hệ thống đo lường điện hoá và ứng dụng xử lý, truyền/thu tín hiệu	67
2.4.1. Cấu trúc hệ thống	67
2.4.2. Truyền thông	68
2.4.2.1. IoT	68
2.4.2.2. MQTT	70
2.4.3. Phân cứng điều khiển và thu thập dữ liệu	72
2.4.3.1. Potentiostat	72
2.4.3.2. Mạch điều khiển	75

2.4.4. Phần mềm xử lý và hiển thị dữ liệu	76
2.4.4.1. Python	76
2.4.4.2. MIT App Inventor	77
Kết luận chương	78
CHƯƠNG 3. THIẾT LẬP THỰC NGHIỆM HỆ THỐNG CẢM BIẾN ĐIỆN HOÁ PHÁT HIỆN BỆNH TÔM ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT WSSV.....	79
3.1. Khảo sát tốc độ quét và bước thế (E step) trong quét CV của điện cực vàng.....	80
3.2. Xây dựng quy trình chức năng hoá điện cực	82
3.2.1. Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC...82	
3.2.1.1. Hoá chất và thiết bị	83
3.2.1.2. Quy trình chức năng hóa điện cực, đánh giá bằng huỳnh quang, SEM/EDX và phép đo điện hóa.....	84
3.2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực cacbon phát hiện protein VP28.....87	
3.2.2.1. Hoá chất và thiết bị	87
3.2.2.2. Quy trình biến tính phủ các hạt nano vàng và chức năng hoá điện cực	89
3.3. Thiết kế hệ thống đo điện hoá di động không dây WPEMS phát hiện bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV	91
3.3.1. Mô tả hệ thống đo điện hóa di động không dây WPEMS.....91	
3.3.2. Chuẩn bị điện cực chức năng và mẫu đo	93
3.3.2.1. Chuẩn bị điện cực chức năng	93
3.3.2.2. Chuẩn bị mẫu	94
3.3.3. Thiết kế phần cứng.....95	
3.3.3.1. Sơ đồ nguyên lý.....95	

3.3.3.2. Giải thuật điều khiển	97
3.3.4. Thiết kế phần mềm.....	100
3.3.4.1. Kiến trúc phần mềm điều khiển	100
3.3.4.2. Xây dựng phần mềm điều khiển	103
3.3.4.3. Xử lý chuỗi dữ liệu dòng-thể từ mạch điều khiển	106
3.3.4.4. Triển khai bộ lọc thông thấp	108
3.3.4.5. Xây dựng ứng dụng hiển thị người dùng	109
3.4. Đánh giá hệ thống	110
3.4.1. Đánh giá hiệu năng phần cứng.....	110
3.4.2. Độ nhạy và giới hạn phát hiện	110
3.4.3. Độ lặp lại, độ ổn định và độ tái lập	111
3.4.4. Độ đặc hiệu	111
Kết luận chương	111
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	113
4.1. Kết quả thiết lập hệ thống	113
4.1.1. Kết quả xây dựng phần cứng.....	113
4.1.2. Kết quả phát triển phần mềm	121
4.1.2.1. Kết quả xử lý tín hiệu.....	121
4.1.2.2. Kết quả xây dựng giao diện người dùng.....	123
4.1.3. Đánh giá hiệu năng phần cứng.....	126
4.1.4. Khảo sát quét điện hoá điện cực vàng và điện cực cacbon.....	128
4.1.5. Kết luận	130
4.2. Kết quả khảo sát, đánh giá hệ thống	130

4.2.1. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC	130
4.2.1.1. Kết quả khảo sát tốc độ quét và bước thế (E step) trong quét CV của điện cực vàng	131
4.2.1.2. Đánh giá hình thái và quang học của điện cực biến tính phát hiện protein BSA-FITC.....	131
4.2.1.3. Kết quả khảo sát tín hiệu điện hoá quy trình biến tính điện cực vàng phát hiện protein BSA	134
4.2.1.4. Kết luận	141
4.2.2. Kết quả phát hiện protein VP28 với hệ đo thương mại	142
4.2.2.1. Khảo sát quy trình biến tính cảm biến miễn dịch	142
4.2.2.2. Phát hiện kháng nguyên VP28	146
4.2.2.3. Kết luận	151
4.2.3. Kết quả phát hiện protein VP28 với hệ đo đề xuất	152
4.2.3.1. Khảo sát quy trình biến tính và phát hiện protein VP28 với hệ đo WPEMS.....	152
4.2.3.2. Kết luận	155
4.2.4. Kết quả bước đầu phát hiện WSSV trên mẫu thực với hệ đo WPEMS đề xuất.....	156
4.3. Một số đề xuất.....	158
4.3.1. Đề xuất hệ thống tự động điều khiển chu trình cảm biến	158
4.3.2. Đề xuất ứng dụng học máy trong dự đoán nhiễm WSSV	159
Kết luận chương	161
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	163

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	166
TÀI LIỆU THAM KHẢO	168
1. PHỤ LỤC 1 - CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC PHÁT HIỆN PROTEIN BSA-FITC SỬ DỤNG SAM L-CYSTEINE	181
P1.1. Cố định kháng thể thông qua liên kết chéo với SAM L-Cysteine sử dụng Glutaraldehyde	181
P1.1.1. Hoá chất và thiết bị	182
P1.1.2. Quy trình chức năng hoá điện cực	182
P1.1.3. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC	183
P1.1.3.1. Kết quả khảo sát tín hiệu quang	183
P1.1.3.2. Kết quả khảo sát tín hiệu điện	184
P1.1.4. Kết luận	187
P1.2. Cố định kháng thể thông qua liên kết cộng hoá trị trên SAM L-Cysteine hoạt hoá bằng EDC/NHS	187
P1.2.1. Hoá chất và thiết bị	187
P1.2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực	188
P1.2.3. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC	188
P1.2.3.1. Kết quả khảo sát tín hiệu quang	188
P1.2.3.2. Kết quả khảo sát tín hiệu điện	190
P1.2.4. Kết luận	192
2. PHỤ LỤC 2 - ỨNG DỤNG MỞ RỘNG CỦA QUY TRÌNH CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC TRONG PHÁT HIỆN PROTEIN NSE	194
P2.1. Hoá chất và thiết bị	194

P2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực	194
P2.3. Kết quả phát hiện protein NSE	195
P2.4. Kết luận	197
3. PHỤ LỤC 3 - MÃ NGUỒN.....	199

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Nhiễm tự nhiên vi-rút WSSV ở các loài giáp xác được thu thập từ vùng ven biển Đài Loan [12].	11
Bảng 1.2. Thiệt hại do vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam, năm 2015 [8].	12
Bảng 2.1. Các thành phần trong mạch điện tương đương Randles.....	64
Bảng 3.1. Giải thuật cho Mạch điều khiển với kết nối không dây.	99
Bảng 3.2. Giải thuật cho Phần mềm điều khiển với kết nối không dây.	106
Bảng 4.1. Khảo sát tốc độ quét và E step.....	131
Bảng 4.2. Khảo sát độ lặp lại của tín hiệu CV.....	147
Bảng 4.3. Phân tích so sánh hiệu suất cảm biến với các công trình nghiên cứu khác.	151
Bảng 4.4. Giá trị dòng điện cực đại trung bình của ba cảm biến khác nhau tại các nồng độ VP28 (được đo lặp lại 4 lần cho mỗi cảm biến).....	153
Bảng 4.5. So sánh kết quả nghiên cứu đề xuất với các công trình khác.	154
Bảng 4.6. Giá trị dòng đỉnh anốt của điện cực SPAuE trong các bước chức năng hóa và phát hiện WSSV bằng phép đo CV và mức suy giảm tín hiệu $\% \Delta I_{\max}$ phát hiện WSSV.	157

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Thống kê tình hình bệnh các Phú Vang, Quảng Điền, Phong Điền, Hương Trà, Phú Lộc từ năm 2019 đến 2021.....	14
Hình 1.2. Tỷ lệ bệnh trên tôm tại Quảng Điền, Huế, năm 2021, WSSV chiếm tỷ lệ cao nhất 20,25%.	15
Hình 1.3. Tôm nhiễm WSSV với các đốm trắng đặc trưng trên vỏ: (a) Quan sát trên giáp đầu ngực; (b) Quan sát dưới kính hiển vi.....	16
Hình 1.4. Hình thái và cấu trúc vi-rút WSSV: (a) Hình thái tổng thể của vi-rút [26]; (b) Cấu trúc cắt dọc minh họa các lớp của vi-rút [27]; (c) Ảnh hiển vi điện tử TEM của vi-rút, thanh tỉ lệ = 100 nm [27].	17
Hình 1.5. Biểu hiện nhiễm vi-rút đốm trắng WSSV trên tôm nuôi nước lợ: (a) Tôm thẻ chân trắng; (b) Tôm sú [38].....	20
Hình 1.6. Mô bệnh học của bệnh đốm trắng trên tôm thẻ chân trắng được quan sát bằng (a) nhuộm H&E; (b) lai tại chỗ ISH; (c) nhuộm H&E; (d) lai tại chỗ ISH; (e) và (f) kính hiển vi điện tử TEM [39].....	24
Hình 1.7. Kết quả Western Blot xác nhận tính đặc hiệu của kháng thể kháng VP28 [45].	27
Hình 1.8. Cấu trúc của cảm biến sinh học.	29
Hình 1.9. Phân loại cảm biến sinh học dựa trên cơ chế chuyển đổi tín hiệu và loại đầu thu sinh học.	30
Hình 1.10. Các điện cực in lưới sử dụng trong luận án: (a) điện cực SPCE với điện cực làm việc cacbon; (b) điện cực SPAuE với điện cực làm việc vàng; (c) Ảnh hiển vi cấu trúc ba điện cực.....	32
Hình 1.11. Đường cong volt–ampe vòng (CV) của các giai đoạn biến tính điện cực vàng trong quá trình chế tạo cảm biến sinh học phát hiện WSSV, đo trong dung dịch điện ly, tốc độ quét 0,1 V/s so với điện cực Ag/AgCl: (a) Điện cực vàng trần; (b) sau	

khi phủ lớp SAM thiourea; (c) sau khi hoạt hóa bằng glutaraldehyde; (d) sau khi cố định protein GST–WBP; (e) sau khi phủ 1–dodecanethiol [54].	34
Hình 1.12. Cảm biến điện hóa phát hiện WSSV dựa trên phương pháp EIS với bề mặt điện cực CSR được biến tính bằng vật liệu nanocompozit Ab–GQD–AuPani. (a) Sơ đồ tổng quan và cơ chế phát hiện WSSV; (b) Biểu đồ Nyquist biểu diễn sự thay đổi trở kháng của cảm biến tại các nồng độ WSSV khác nhau trong khoảng 10^2 – 10^9 copies/mL; (c) Đường hiệu chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa phần trăm biến thiên điện trở truyền điện tích $\% \Delta R_{CT}$ và nồng độ WSSV.	40
Hình 1.13. Minh họa Các yếu tố rủi ro trong quá trình nuôi tôm và Hệ thống chẩn đoán tại chỗ được đề xuất để phát hiện bệnh đốm trắng trên tôm nuôi.	43
Hình 1.14. Sơ đồ khối của hệ thống cảm biến sinh học điện hóa đề xuất.	44
Hình 2.1. Chức năng hóa điện cực dựa trên cơ chế kháng thể - kháng nguyên.	47
Hình 2.2. Cấu trúc, kích thước và các vị trí chức năng quan trọng của phân tử kháng thể, cùng các định hướng bám đặc trưng trên bề mặt điện cực [79].	49
Hình 2.3. Các phương pháp cố định định hướng kháng thể lên bề mặt vật liệu. (a) Liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm amine ($-\text{NH}_2$) và carboxyl ($-\text{COOH}$) thông qua phản ứng hoạt hóa EDC/NHS; (b) Khử cầu nối disulfide ($\text{S}-\text{S}$) của kháng thể bằng TCEP hoặc 2-MEA để tạo nhóm thiol tự do ($-\text{SH}$), sau đó liên kết với nền vàng thông qua liên kết $\text{Au}-\text{S}$; (c) Oxy hóa nhóm carbohydrate trong vùng Fc của kháng thể phản ứng với bề mặt mang nhóm hydrazide, hình thành liên kết hydrazone định hướng cao giữa kháng thể và vật liệu nền [79].	53
Hình 2.4. Đáp ứng phổ trở kháng của điện cực trần (Bare) và điện cực được gắn SAM.	55
Hình 2.5. Ảnh hiển vi điện tử TEM của các cấu trúc hạt vàng: (a) Hạt nano vàng hình cầu ($d = 20$ nm); (b) Hạt nano vàng hình cầu ($d = 45$ nm); (c) Hạt nano vàng dạng thanh [98].	56
Hình 2.6. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa dòng và thế khi quét CV.	59

Hình 2.7. Phương pháp SWV: (a) Áp điện thế; (b) Đồ thị đặc trưng [PalmSens]. ...	62
Hình 2.8. Mô hình mạch điện tương đương Randles: C_{dl} điện dung lớp kép, R_{CT} điện trở truyền điện tích, R_s điện trở dung dịch, Z_W trở kháng Warburg [100].	63
Hình 2.9. Mạch tương đương Randles và phổ tổng trở: (a, b) tại vùng tần số cao; (c, d) tại vùng tần số thấp.	65
Hình 2.10. Mạch tương đương Randles và phổ tổng trở khi quét trên dải rộng từ tần số cao đến thấp.	67
Hình 2.11. Mô hình khái quát về IoT (Internet of Things) kết nối vạn vật [104].	69
Hình 2.12. Mô hình truyền thông MQTT theo cơ chế Publish/Subscribe.	71
Hình 2.13. Sơ đồ mạch Potentiostat cơ bản [111].	73
Hình 2.14. MIT App Inventor – Nền tảng hỗ trợ phát triển ứng dụng di động [118]	77
Hình 3.1. Quy trình thực nghiệm chức năng hóa điện cực phát hiện WSSV trên hệ đo thương mại và hệ đo tự xây dựng (WPEMS).	81
Hình 3.2. Kết nối thiết bị đo PalmSens4 với điện cực SPAuE và phần mềm PS Trace 5.9 trên máy tính.	84
Hình 3.3. Sơ đồ quá trình biến tính điện cực: (1) Tạo SAM MUA; (2) Hoạt hóa SAM, cố định kháng thể; (3) Bắt giữ kháng nguyên BSA-FITC; (4) Thu ảnh huỳnh quang và phân tích SEM/EDX; (5) Thực hiện phép đo điện hóa.	85
Hình 3.4. Kết nối thiết bị đo CS350M EIS Potentiostat/Galvanostat với điện cực SPCE và phần mềm CS Studio 6 trên máy tính.	88
Hình 3.5. Sơ đồ quy trình đề xuất chức năng hoá cảm biến phát hiện VP28 và kết nối cảm biến với hệ đo điện hóa.	89
Hình 3.6. Hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS tích hợp cảm biến phát hiện VP28.	92

Hình 3.7. Sơ đồ khối hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS tích hợp cảm biến phát hiện VP28.	93
Hình 3.8. (a) Mẫu tôm sú dương tính với WSSV với chiều dài 14-15 cm, trọng lượng 15,94-15,96g; (b) Vỏ đầu tôm với các đốm được quan sát dưới kính hiển vi.	94
Hình 3.9. Quy trình chuẩn bị mẫu tôm WSSV cho thí nghiệm [13].	95
Hình 3.10. Sơ đồ nguyên lý Mạch điều khiển.	96
Hình 3.11. Sơ đồ nguyên lý Mạch điều khiển tích hợp màn hình LCD và nguồn pin: (a) Mạch điều khiển; (b) Màn hình LCD; (c) Pin.	96
Hình 3.12. Sơ đồ giải thuật lập trình Mạch điều khiển với kết nối không dây và có dây.	98
Hình 3.13. Kiến trúc phần mềm.	101
Hình 3.14. Sơ đồ giải thuật điều khiển và xử lý dữ liệu của Phần mềm điều khiển.	104
Hình 3.15. Nhận và tách chuỗi giá trị dòng-thế.	107
Hình 3.16. Xây dựng ứng dụng hiển thị trên điện thoại hệ điều hành Android.	109
Hình 4.1. Kết quả thiết kế hệ thống.	114
Hình 4.2. Thiết bị đo điện hoá di động không dây WPEMS.	115
Hình 4.3. Sơ đồ đấu nối thiết bị tích hợp màn hình LCD và nguồn pin sạc.	116
Hình 4.4. Sơ đồ cấp nguồn, phân phối điện áp và dòng tiêu thụ của hệ đo điện hoá cầm tay.	118
Hình 4.5. Thiết kế 3D bố trí bên trong vỏ thiết bị.	119
Hình 4.6. Thiết kế 3D bố trí bên ngoài vỏ thiết bị.	119
Hình 4.7. Thiết bị hoàn chỉnh với màn hình và nguồn pin tích hợp.	120
Hình 4.8. Tín hiệu đo CV (a) trước và (b) sau khi lọc nhiễu.	121

Hình 4.9. Kết quả khảo sát các bậc bộ lọc: (a) bậc 1; (b) bậc 2; (c) bậc 3; (d) bậc 4; (e) bậc 5.....	122
Hình 4.10. Giao diện người dùng trên máy tính hệ điều hành Windows: (a) Giao diện khởi động; (b) Giao diện sau khi đo; (c) Các file được lưu.	124
Hình 4.11. Giao diện người dùng trên điện thoại hệ điều hành Android.	125
Hình 4.12. Thiết lập kết nối đo điện hoá: (a) điện cực; (b) thiết bị đo; (c) giao diện người dùng.	126
Hình 4.13. Kết quả khảo sát quá trình truyền và nhận tín hiệu ở chế độ có dây (Wired – đường màu đỏ) và không dây (Wireless – đường màu xanh): (a) 100 lượt; (b) 8100 lượt.....	127
Hình 4.14. Hình dạng đồ thị CV ở các chế độ đo: Có dây (Wired – đường màu đỏ); Không dây (Wireless – đường màu xanh).....	128
Hình 4.15. Kết quả khảo sát điện cực trần: (a) điện cực vàng; (b) điện cực cacbon.	129
Hình 4.16. Khảo sát điện cực vàng SPAuE trần: (a) Cấu trúc và (b) Ảnh hiển vi cấu trúc ba điện cực; (c) Ảnh SEM và (d) Phổ EDX bề mặt điện cực làm việc (Au)...132	
Hình 4.17. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC (Ag) ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM được bắt giữ trên bề mặt điện cực đã cố định kháng thể anti-BSA (Ab). Các khung chữ nhật nét đứt biểu thị vùng ROI cố định để thực hiện định lượng cường độ huỳnh quang.	133
Hình 4.18. Đánh giá huỳnh quang và hình thái bề mặt của điện cực sau khi gắn BSA-FITC: (a) Cường độ huỳnh quang của protein BSA-FITC ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM ; (b) Ảnh SEM của điện cực sau khi bắt giữ protein BSA-FITC ở nồng độ 5,0 μM	134

Hình 4.19. Đáp ứng điện hóa của các điện cực đối chứng không có SAM: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực trần, điện cực cố định kháng thể và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC.....	135
Hình 4.20. Phổ EIS và xác nhận huỳnh quang của các điện cực đối chứng không có SAM: (a) Đồ thị Nyquist của điện cực trần, điện cực cố định kháng thể và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC 8,0 μM (Hình chèn: mạch tương đương Randles); (b) So sánh trở kháng giữa điện cực cố định kháng thể và điện cực bắt giữ BSA-FITC. (Hình chèn: ảnh huỳnh quang của các điện cực đối chứng không có SAM: điện cực cố định kháng thể (trên) và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC 8,0 μM (dưới)).	136
Hình 4.21. Đáp ứng điện hóa của các điện cực được biến tính bởi SAM: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực trần, điện cực được biến tính bởi MUA và L-Cysteine.....	137
Hình 4.22. Phổ EIS của các điện cực được biến tính bởi SAM: (a) Đồ thị Nyquist của điện cực trần, điện cực được biến tính bởi MUA và L-Cysteine (b) So sánh trở kháng giữa SAM MUA và L-Cysteine. (Hình chèn: đồ thị Nyquist của SPAuE trần).	138
Hình 4.23. Đáp ứng điện hóa của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM).	139
Hình 4.24. (a) Phổ EIS quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM); (b) Đồ thị hiệu chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của $\%\Delta R_{CT}$ vào nồng độ BSA-FITC (Hình chèn: sơ đồ minh họa phép đo $\%\Delta R_{CT}$ so với giá trị nền sau khi gắn kháng thể).....	140
Hình 4.25. Quá trình phủ AuNPs: (a) Quét 20 vòng CV trên điện cực BareCE trong dung dịch HAuCl_4 165 μM từ $-0,6$ V đến $+0,5$ V (Hình chèn: quét CV điện cực BareCE trong dung dịch điện ly cùng dải và tốc độ quét); (b) Quét 7 vòng CV trên điện cực CE/AuNPs trong dung dịch H_2SO_4 1 M từ $-0,2$ V đến $+1,4$ V, ở tốc độ	

quét 50 mV/s (Hình chèn: quét CV điện cực BareCE trong dung dịch H_2SO_4 cùng dải và tốc độ quét).	142
Hình 4.26. (a) Đồ thị CV quét trên BareCE và CE/AuNPs và BareAuE trong dung dịch H_2SO_4 1 M từ $-0,2$ V đến $+1,4$ V, ở tốc độ quét 50 mV/s; (b) Ảnh SEM của AuNPs trên CE/AuNPs (Hình chèn: Ảnh SEM phóng đại các hạt vàng có đường kính từ 48 đến 58 nm).	143
Hình 4.27. (a) Đồ thị Nyquist (Hình chèn: Mạch tương đương Randles) và (b) Đồ thị CV của điện cực BareCE và CE/AuNPs trong dung dịch điện ly ở tốc độ quét 50 mV/s với điện cực so sánh Ag/AgCl.	144
Hình 4.28. (a) Đồ thị Nyquist và (b) Đồ thị CV thay đổi sau khi phủ AuNPs và hình thành SAM.	145
Hình 4.29. (a) Đồ thị Nyquist và (b) Đồ thị CV thay đổi trong quá trình biến tính từng bước để cố định đầu thu sinh học ở nồng độ 150 $\mu\text{g/mL}$: Kích hoạt SAM (activeMUA), cố định kháng thể (anti-VP28), chặn liên kết không đặc hiệu (BSA).	146
Hình 4.30. (a) Đồ thị Nyquist đáp ứng EIS và (b) Đồ thị CV của quá trình phát hiện protein VP28 ở các nồng độ khác nhau.	147
Hình 4.31. (a) Đường đặc tính sử dụng ΔR_{CT} làm hàm của nồng độ protein VP28 (Hình chèn: Phương pháp Western Blot phát hiện VP28. M: Thang Protein); (b) Độ chọn lọc của điện cực CE/AuNPs/activeMUA/BSA/anti-VP28 đối với protein Ovalbumin và NSE.	149
Hình 4.32. Đồ thị Nyquist đáp ứng EIS ở các nồng độ khác nhau của protein (a) Ovalbumin; (b) NSE.	150
Hình 4.33. (a) Tín hiệu đo CV của quy trình chức năng hóa và phát hiện protein VP28 ở các nồng độ khác nhau; (b) Đường đặc tính sử dụng $\% \Delta I_{\max}$ làm hàm của nồng độ protein VP28. Mỗi thí nghiệm phát hiện VP28 được thực hiện bốn lần và lặp lại trên ba cảm biến khác nhau.	153

Hình 4.34. Phương thức vận hành thiết bị.	155
Hình 4.35. Tín hiệu đo CV của quy trình chức năng hóa và phát hiện (a) protein VP28; (b) WSSV.	157
Hình 4.36. Hệ thống đề xuất điều khiển tự động chuyển động cảm biến. Hành trình cảm biến: mũi tên màu đỏ.	158
Hình 4.37. Minh họa quy trình ứng dụng học máy trong phát hiện tôm nhiễm WSSV sử dụng YOLO Object Detection.	160
Hình P1.1. Sơ đồ quy trình đề xuất: Bước (1) Hình thành SAM; Bước (2) Cố định kháng thể; Bước (3) Bắt giữ protein.	182
Hình P1.2. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC trên bề mặt điện cực làm việc SPAuE/SAM/anti-BSA/BSA ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM	184
Hình P1.3. Cường độ huỳnh quang ở các nồng độ protein từ 0,5 μM đến 8,0 μM	184
Hình P1.4. (a) Tín hiệu CV trước và sau khi hình thành SAM L-Cysteine trên bề mặt điện cực; (b) Tín hiệu CV sau khi hình thành SAM, cố định kháng thể BSA (anti-BSA) và bắt giữ protein ở các nồng độ protein BSA-FITC khác nhau.	185
Hình P1.5. Tín hiệu SWV sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và bắt giữ protein ở các nồng độ protein BSA khác nhau.	185
Hình P1.6. (a) Tín hiệu EIS sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và thu giữ protein ở các nồng độ protein BSA-FITC khác nhau; (b) ΔR_{ct} được vẽ dưới dạng hàm của nồng độ protein BSA-FITC.	187
Hình P1.7. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC (Ag) ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM được bắt giữ trên bề mặt điện cực cố định kháng thể anti-BSA (Ab). Các khung chữ nhật nét đứt biểu thị vùng ROI cố định để thực hiện định lượng cường độ huỳnh quang.	189

Hình P1.8. Đánh giá huỳnh quang và hình thái bề mặt của điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC: (a) Cường độ huỳnh quang của protein BSA-FITC ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM ; (b) Ảnh SEM của điện cực sau khi bắt giữ protein BSA-FITC ở nồng độ 5,0 μM	189
Hình P1.9. Đáp ứng điện hóa của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực phủ L-Cysteine, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM).	190
Hình P1.10. (a) Phổ EIS của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM); (b) Đồ thị hiệu chuẩn biểu diễn mối quan hệ tuyến tính của $\%\Delta R_{CT}$ vào nồng độ BSA-FITC (Hình chèn: sơ đồ minh họa phép đo $\%\Delta R_{CT}$ so với giá trị nền sau khi gắn kháng thể).	191
Hình P2.1. Quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein NSE.	195
Hình P2.2. Phát hiện protein NSE: (a) Đáp ứng phổ trở kháng quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện NSE trong dải nồng độ 10 ng/mL đến 500 ng/mL; (b) Đường đặc tính sử dụng ΔR_{CT} là hàm của nồng độ protein NSE (Hình chèn: bề mặt điện cực làm việc được phủ các hạt nano vàng).	196
Hình P2.3. (a) Đáp ứng phổ trở kháng; (b) Giá trị R_{CT} của điện cực chức năng hoá phát hiện protein NSE được pha loãng trong các mẫu huyết thanh.	197

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ đầy đủ	Ý nghĩa
Ag	Antigen	Kháng nguyên
Ab	Antibody	Kháng thể
AuNPs	Gold-Nano Particles	Hạt nano vàng
Anti-BSA	Anti-Bovine Serum Albumin	Kháng thể kháng BSA
BSA-FITC	Bovine Serum Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate	Albumin huyết thanh bò (có gắn huỳnh quang)
CV	Cyclic Voltammetry	Kỹ thuật quét thế tuần hoàn
EDC/NHS	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/Ester N-hydroxysuccinimide	Hỗn hợp hoạt hóa SAM
EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy	Phổ tán sắc năng lượng tia X
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay	Kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	Phương pháp phổ tổng trở điện hóa
IDE	Integrated Development Environment	Môi trường phát triển tích hợp cho phép viết mã, biên dịch và nạp chương trình điều khiển cho ESP32
MQTT	Message Queuing Telemetry Transport	Giao thức truyền thông nhẹ cho các ứng dụng đo lường từ xa, hoạt động theo mô hình

		publish/subscribe
NSE	Neuron-Specific Enolase	Protein chỉ dấu sinh học của bệnh ung thư phổi
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase, kỹ thuật xét nghiệm phát hiện trình tự gen đặc trưng WSSV
ROI	Region Of Interest	Vùng khảo sát
SAM	Self-assembled monolayer	Đơn lớp tự lắp ráp
SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
SPCE	Screen Printed Carbon Electrode	Điện cực in lưới cacbon
SPAuE	Screen Printed Gold Electrode	Điện cực in lưới vàng
SWV	Square Wave Voltammetry	Phương pháp von-ampe sóng vuông
TIA	Transimpedance Amplifier	Mạch khuếch đại chuyển đổi dòng điện thành điện áp
VP28	Viral Protein 28	Protein chỉ dấu sinh học của bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV
WSSV	White Spot Syndrome Virus	Vi-rút gây hội chứng đốm trắng trên tôm
WPEMS	Wireless Portable Electrochemical Measurement System	Hệ thống đo điện hoá di động không dây (Hệ thống được xây dựng trong luận án)

MỞ ĐẦU

1. Sự cần thiết của đề tài

Ngành nuôi tôm toàn cầu đang duy trì tốc độ tăng trưởng mạnh mẽ, dự kiến đạt 6,1 triệu tấn vào năm 2025, trong đó tôm thẻ chân trắng và tôm sú chiếm khoảng 80% tổng sản lượng. Với giá trị thương mại cao và vai trò trọng yếu trong xuất khẩu thủy sản, nghề nuôi tôm đã trở thành ngành công nghiệp chiến lược đóng góp đáng kể cho an ninh lương thực, việc làm và tăng trưởng kinh tế của nhiều quốc gia ven biển. Tuy nhiên, bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV (White Spot Syndrome Virus) vẫn là mối đe dọa lớn nhất đối với sự phát triển bền vững của ngành này. Vi-rút có khả năng lây lan cực nhanh, gây tỷ lệ chết 100% chỉ sau vài ngày, làm thiệt hại toàn cầu ước tính 8–15 tỷ USD, và mỗi năm tiếp tục gây thêm khoảng 1 tỷ USD tổn thất, tương đương khoảng 10% sản lượng tôm thế giới. Đáng lo ngại hơn, các khảo sát tại vùng ven biển Đài Loan đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm WSSV tự nhiên lên đến 77,2% ở tôm sú, chứng minh rằng vi-rút không chỉ tồn tại trong môi trường nuôi mà còn lưu hành trong quần thể tự nhiên, luôn tiềm ẩn nguy cơ tái xâm nhập và bùng phát dịch diện rộng.

Tại Việt Nam, WSSV xuất hiện từ đầu thập niên 1990 và đã nhiều lần diễn ra trên diện rộng, gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm. Chỉ riêng năm 2011, khu vực Đồng bằng sông Cửu Long ghi nhận hơn 20.854 ha diện tích bị thiệt hại, và trong các năm tiếp theo, con số này vẫn duy trì ở mức hàng chục nghìn hecta ao nuôi bị ảnh hưởng. Đặc biệt, tại thành phố Huế, nơi có hệ thống đầm phá Tam Giang – Cầu Hai lớn, bệnh đốm trắng thường xuyên tái phát ở các vùng nuôi trọng điểm như Phú Vang, Quảng Điền và Phong Điền, đe dọa nghiêm trọng đến sinh kế người dân. Năm 2021, trong số các mẫu bệnh được thu thập và phân tích, tỷ lệ nhiễm WSSV chiếm tới 20,25%, cho thấy mức độ lưu hành cao của mầm bệnh. Các đợt bùng phát liên tiếp trong những năm gần đây đã gây thiệt hại hàng chục tỷ đồng, buộc nhiều hộ nuôi phải xả ao, ngừng vụ hoặc chuyển đổi đối tượng nuôi, ảnh hưởng lớn đến kinh tế địa phương và an ninh sinh kế vùng ven biển.

Tình hình trên cho thấy bệnh đốm trắng do WSSV vẫn là mối đe dọa thường trực, đặc biệt trong bối cảnh biến đổi khí hậu và mật độ nuôi ngày càng tăng. Nguy cơ này không chỉ mang tính quốc gia mà còn có phạm vi khu vực, đòi hỏi các giải pháp phát hiện, giám sát chủ động và kiểm soát hiệu quả ngay tại hiện trường, nhằm bảo đảm sự phát triển bền vững của ngành nuôi tôm.

Các phương pháp phát hiện chủ yếu hiện nay của người nông dân thường quan sát lâm sàng hay xét nghiệm PCR tại các trung tâm xét nghiệm. Các phương pháp này vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu thực tiễn của người nuôi. Các kỹ thuật này thường phát hiện muộn, hoặc phụ thuộc vào thiết bị hiện đại và kỹ thuật viên, nên không thể triển khai trực tiếp tại ao nuôi. Hậu quả là người nuôi thường không kịp thời phát hiện trong giai đoạn sớm của bệnh để tiến hành cách ly và xử lý kịp thời, khiến bệnh lan nhanh theo chuỗi cung ứng giống, thức ăn, nguồn nước, làm chi phí kiểm soát tăng cao, gia tăng rủi ro gián đoạn sản xuất và ảnh hưởng nghiêm trọng đến hiệu quả kinh tế của toàn chuỗi nuôi trồng.

Trong bối cảnh đó, thiết bị chẩn đoán tại chỗ dựa trên cảm biến điện hoá được xem là hướng phát triển tất yếu cho giám sát và kiểm soát dịch bệnh trong nuôi tôm. Công nghệ này cho phép phát hiện nhanh, chính xác, chi phí hợp lý và có thể vận hành trực tiếp tại hiện trường, giúp cung cấp tín hiệu cảnh báo cho người nuôi, qua đó giảm nguy cơ lây lan, hạn chế thiệt hại và duy trì ổn định sản xuất.

Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn đó, luận án **“Nghiên cứu phát triển thiết bị chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút trên tôm nuôi nước lợ”** đặt mục tiêu làm chủ quy trình chức năng hoá điện cực, phát triển cảm biến điện hoá đặc hiệu với protein VP28, chỉ dấu đặc trưng của vi-rút WSSV, đồng thời tích hợp hệ đo điện hoá di động nhằm hướng tới giám sát ngay tại ao nuôi.

Đặc biệt, bằng việc chứng minh khả năng áp dụng quy trình cho các protein khác, nghiên cứu khẳng định tính nền tảng, đa mục tiêu của công nghệ, khả năng mở rộng hệ thống cảm biến điện hoá tích hợp phục vụ phát hiện nhiều tác nhân gây bệnh thủy sản trong cùng hệ thống thiết bị thống nhất và linh hoạt.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu chung

Phát triển cảm biến điện hóa có khả năng phát hiện nhanh, chính xác và đáng tin cậy bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV trên tôm nuôi, đồng thời xây dựng hệ thống thiết bị chẩn đoán tại chỗ tích hợp đo, xử lý và hiển thị dữ liệu.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Nghiên cứu công nghệ cảm biến điện hoá Electrochemical Sensor ứng dụng trong thiết bị chẩn đoán tại chỗ.
- Xác định đầu thu sinh học đặc hiệu với WSSV và cơ chế nhận biết phù hợp.
- Xây dựng quy trình chức năng hóa bề mặt điện cực để cố định đầu thu sinh học.
- Phát triển hệ thống đo điện hóa, tích hợp phần mềm xử lý tín hiệu.
- Khảo sát độ nhạy, độ đặc hiệu, độ ổn định và giới hạn phát hiện của cảm biến điện hóa phát hiện WSSV.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Cảm biến điện hóa phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên tôm nuôi.

3.2. Phạm vi nghiên cứu

Thực nghiệm phát triển và đánh giá hiệu quả thiết bị cảm biến điện hóa phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên mẫu chuẩn trong phòng thí nghiệm.

4. Phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng phương pháp nghiên cứu liên ngành, kết hợp điện hoá, sinh học phân tử và kỹ thuật điện tử để phát triển thiết bị chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV trên tôm nuôi, bao gồm:

- Phương pháp lý thuyết:

Dựa trên các cơ sở lý thuyết về điện hoá học và sinh học phân tử, luận án xây dựng quy trình chức năng hoá điện cực dựa trên cơ chế hình thành đơn lớp tự lắp ráp SAM từ các hợp chất thiol, nhằm tạo nền ổn định cho việc cố định kháng thể. Các phản ứng oxi hoá-khử và quá trình truyền điện tích tại giao diện điện cực-dung dịch được phân tích theo mô hình mạch tương đương Randles để làm rõ sự biến đổi tín hiệu điện hoá sau từng giai đoạn biến tính.

- Phương pháp thiết kế kỹ thuật:

Hệ thống đo điện hoá di động không dây WPEMS (Wireless Portable Electrochemical Measurement System) được thiết kế với ba khối chức năng: điện cực cảm biến sinh học, mạch điều khiển tích hợp mạch đo điện hoá, và giao diện người dùng. Hệ thống cho phép đo, xử lý, truyền và hiển thị tín hiệu điện hoá theo thời gian thực. Phần mềm điều khiển được lập trình bằng Python, trích xuất tự động giá trị dòng đỉnh, điện thế đỉnh và nồng độ phân tích.

- Phương pháp thực nghiệm:

Thực hiện các thí nghiệm liên quan đến quy trình chức năng hoá điện cực. Các đặc trưng điện hoá được đánh giá bằng kỹ thuật CV, SWV và EIS; hình thái bề mặt được quan sát bằng SEM/EDX; và khả năng gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể-kháng nguyên được kiểm chứng bằng Western Blot. Các phép đo được lặp lại trên nhiều điện cực khác nhau, đánh giá độ nhạy, giới hạn phát hiện, độ ổn định và tính chọn lọc của cảm biến trong điều kiện thực nghiệm.

5. Các kết quả nghiên cứu thu được

Luận án đã phát triển thành công quy trình chức năng hoá điện cực và phát triển hệ thống đo điện hoá di động không dây phát hiện protein VP28, chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút gây hội chứng ốm trắng WSSV trên tôm.

Các thí nghiệm đối chứng đã làm rõ vai trò trung gian quan trọng của đơn lớp tự lắp ráp SAM trong việc cố định kháng thể và tăng cường tính ổn định của bề

mặt điện cực. Bên cạnh đó, quá trình phủ các hạt nano vàng AuNPs trên điện cực đã cải thiện đáng kể độ dẫn điện và diện tích bề mặt hoạt hoá, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình thành lớp SAM và gắn kháng thể anti-VP28. Cảm biến sau khi chức năng hoá cố định kháng thể cho thấy mối quan hệ tuyến tính giữa ΔR_{CT} và nồng độ VP28 với độ lặp lại và tính chọn lọc cao.

Hệ thống đo điện hoá di động được thiết kế và thiết lập hoàn chỉnh, ổn định, với cấu trúc nhỏ gọn, tích hợp các khối chức năng gồm mạch điều khiển tích hợp mạch đo điện hoá. Phần mềm điều khiển cho phép xử lý, hiển thị và lưu trữ dữ liệu, đồng thời trích xuất tự động các giá trị dòng đỉnh, điện thế đỉnh và nồng độ. Khi kết nối với cảm biến anti-VP28, hệ thống đo CV ghi nhận mối tương quan tuyến tính mạnh giữa phần trăm biến thiên dòng điện đỉnh $\% \Delta I_{max}$ và nồng độ VP28 trong khoảng 5–25 ng/mL, với hệ số tương quan $R^2 = 0,994$ và giới hạn phát hiện $LOD = 2,38$ ng/mL. Khi thử nghiệm trên mẫu tôm dương tính với WSSV, hệ thống thu được tín hiệu tương đồng với kết quả PCR, khẳng định khả năng phát hiện nhanh, và khả thi của thiết bị trong điều kiện hiện trường.

Quy trình chức năng hoá điện cực được phát triển trong nghiên cứu này không chỉ hiệu quả đối với VP28 mà còn có thể mở rộng cho các protein khác. Cụ thể, quy trình đã được áp dụng thành công để phát hiện protein NSE, qua đó chứng minh tính đa ứng dụng của nền tảng cảm biến điện hoá được đề xuất, khẳng định tiềm năng phát triển cảm biến điện hoá đa mục tiêu dựa trên cùng một công nghệ lõi.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm phần Mở đầu, phần Kết luận và kiến nghị, 4 chương chính và phần Phụ lục, được trình bày từ tổng quan, cơ sở lý thuyết, thiết kế hệ thống, kết quả thiết lập hệ thống phát hiện bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV, cụ thể như sau:

Mở đầu

Chương 1. Tổng quan về bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV và các phương pháp phát hiện.

Trong chương này, luận án trình bày tổng quan về vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV (White Spot Syndrome Virus), với protein vỏ VP28 được xem là chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút. Bên cạnh đó, chương này cũng giới thiệu bệnh tôm đốm trắng do WSSV gây ra, một trong những dịch bệnh nguy hiểm nhất trong nuôi tôm nước lợ, và các phương pháp phát hiện hiện nay, bao gồm phương pháp truyền thống, phương pháp PCR, miễn dịch học và cảm biến sinh học điện hóa. Ngoài ra, chương cũng trình bày tổng quan các nghiên cứu trong và ngoài nước về phát hiện WSSV, phân tích hạn chế của các hướng tiếp cận hiện tại, và đề xuất hệ thống thiết bị chẩn đoán tại chỗ dựa trên cảm biến điện hóa. Từ những cơ sở lý thuyết và kết quả tổng quan, tác giả xác định định hướng nghiên cứu trọng tâm của luận án là phát triển hệ thống cảm biến điện hóa di động, kết nối IoT, có khả năng phát hiện nhanh, nhạy và định lượng WSSV tại chỗ.

Chương 2: Cơ sở lý thuyết và nguyên lý phát triển thiết bị điện hoá phát hiện WSSV.

Chương 2 làm rõ cơ chế chức năng hóa bề mặt điện cực, bao gồm đầu thu sinh học, đơn lớp tự lắp ráp (SAM) và vật liệu nano trong việc tăng cường khả năng nhận biết cũng như truyền tín hiệu điện hóa. Tiếp theo, các phương pháp đo điện hóa, bao gồm: quét thế tuần hoàn CV, von-ampe sóng vuông SWV và phổ tổng trở điện hoá EIS, được trình bày nhằm xác định các đặc trưng điện hóa liên quan đến quá trình phát hiện WSSV. Cuối cùng, chương 2 giới thiệu cấu trúc hệ thống đo lường điện hóa tích hợp IoT, cùng các công cụ hỗ trợ xây dựng phần cứng và phần mềm điều khiển (Potentiostat, mạch điều khiển, Arduino IDE, Python, MIT App Inventor) phục vụ việc xử lý và truyền, thu tín hiệu theo thời gian thực.

Chương 3. Thiết lập thực nghiệm hệ thống cảm biến điện hoá phát hiện bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV.

Chương 3 trình bày phương pháp thực nghiệm biến tính bề mặt điện cực và phát triển cảm biến điện hoá phát hiện vi-rút WSSV. Kỹ thuật quét thế tuần hoàn (CV) được sử dụng để phủ điện hoá các hạt nano vàng (AuNPs) trên nền điện cực cacbon nhằm tăng khả năng dẫn điện và diện tích hoạt hoá, đồng thời đánh giá đặc tính điện hoá của bề mặt điện cực sau từng giai đoạn chức năng hoá. Các phép đo phổ tổng trở điện hoá (EIS) và von-ampe sóng vuông (SWV) được triển khai để theo dõi sự biến thiên tín hiệu điện hoá trong quá trình chức năng hoá điện cực và phát hiện protein mục tiêu.

Bên cạnh đó, các kỹ thuật hiển vi điện tử quét (SEM) và phổ tán sắc năng lượng (EDX) được sử dụng để phân tích hình thái và thành phần vật liệu, xác nhận sự phân bố đồng đều của AuNPs trên bề mặt điện cực. Phương pháp Western Blot được áp dụng để chứng minh tính đặc hiệu sinh học của phản ứng giữa kháng thể anti-VP28 và kháng nguyên VP28.

Ngoài ra, chương này cũng mô tả việc thiết kế và thiết lập hệ thống đo điện hoá di động không dây WPEMS (Wireless Portable Electrochemical Measurement System), bao gồm: (i) cảm biến miễn dịch điện hoá với điện cực Au phủ SAM cố định kháng thể anti-VP28, (ii) mạch đo và điều khiển tích hợp, và (iii) giao diện người dùng hiển thị dữ liệu thời gian thực, phục vụ phát hiện tại chỗ protein VP28 – chỉ dấu đặc trưng của WSSV.

Chương 4. Kết quả và thảo luận.

Chương 4 trình bày kết quả quy trình chức năng hoá điện cực cảm biến điện hoá phát hiện vi-rút WSSV. Hai mô hình được triển khai nhằm xác nhận cơ chế và hiệu quả của quy trình chức năng hoá điện cực: (1) mô hình phát hiện protein BSA-FITC trên điện cực vàng SPAuE, minh chứng vai trò của lớp SAM trong cố định sinh học và truyền tín hiệu điện hoá; (2) mô hình phát hiện kháng nguyên VP28 đặc trưng của WSSV trên điện cực cacbon SPCE phủ AuNPs, hình thành SAM, cố định kháng thể anti-VP28.

Bên cạnh đó, chương này trình bày thiết lập và đánh giá hệ thống đo điện hoá di động không dây WPEMS (Wireless Portable Electrochemical Measurement System) phát hiện protein VP28. Hệ thống bao gồm cảm biến miễn dịch điện hoá được chức năng hoá kháng thể đặc hiệu, mạch điều khiển tích hợp mạch đo, và giao diện người dùng tương thích với máy tính Windows và thiết bị di động Android, cho phép hiển thị và lưu trữ dữ liệu theo thời gian thực qua kết nối có dây hoặc không dây. Kết quả khẳng định hiệu quả, tính ổn định và tiềm năng ứng dụng thực tiễn của hệ thống cảm biến điện hoá di động trong giám sát và cảnh báo bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV tại ao nuôi.

Kết luận và kiến nghị

Phụ lục 1. Chức năng hoá điện cực phát hiện protein BSA-FITC sử dụng SAM L-Cysteine.

Phụ lục 2. Ứng dụng mở rộng của quy trình chức năng hóa điện cực trong phát hiện protein NSE.

Phụ lục 3. Link mã nguồn chương trình lập trình và hướng dẫn cài đặt, sử dụng phần mềm.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH TÔM ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT WSSV VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN

Cảm biến sinh học điện hoá là hướng nghiên cứu liên ngành kết hợp giữa hóa học, vật lý, sinh học phân tử, khoa học vật liệu và kỹ thuật điện tử, đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các công cụ chẩn đoán nhanh và chính xác. Khác với các phương pháp phân tích truyền thống, cảm biến sinh học điện hoá có khả năng chuyển đổi trực tiếp các tương tác sinh học đặc hiệu trên bề mặt điện cực thành tín hiệu điện, cho phép định lượng mục tiêu với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Những ưu điểm như cấu trúc đơn giản, thao tác dễ dàng, chi phí hợp lý và khả năng thu nhận tín hiệu theo thời gian thực đã giúp loại cảm biến này trở thành một trong những nền tảng được quan tâm hàng đầu trong các ứng dụng y sinh, giám sát môi trường, an toàn thực phẩm và nuôi trồng thủy sản, đặc biệt trong việc phát hiện nhanh các tác nhân gây bệnh.

Trong chương này, luận án trình bày tổng quan về vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV (White Spot Syndrome Virus), với protein vỏ VP28 được xem là chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút. Bên cạnh đó, chương này cũng giới thiệu bệnh tôm đốm trắng do WSSV gây ra, một trong những dịch bệnh nguy hiểm nhất trong nuôi tôm nước lợ, và các phương pháp phát hiện hiện nay, bao gồm phương pháp truyền thống, phương pháp PCR, miễn dịch học và cảm biến sinh học điện hóa. Ngoài ra, chương cũng trình bày tổng quan các nghiên cứu trong và ngoài nước về phát hiện WSSV, phân tích hạn chế của các hướng tiếp cận hiện tại, và đề xuất hệ thống thiết bị chẩn đoán tại chỗ dựa trên cảm biến điện hóa. Từ những cơ sở lý thuyết và kết quả tổng quan, tác giả xác định định hướng nghiên cứu trọng tâm của luận án là phát triển hệ thống cảm biến điện hóa di động, hỗ trợ kết nối không dây, có khả năng phát hiện nhanh, nhạy và định lượng WSSV tại chỗ.

1.1. Bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV

1.1.1. Bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV và tác động đến ngành nuôi tôm

1.1.1.1. Tình hình bệnh WSSV trên thế giới

Ngành nuôi tôm toàn cầu tiếp tục duy trì đà tăng trưởng ổn định, với sản lượng ước đạt 6,1 triệu tấn trong năm 2025, tăng 2% so với năm 2024, sau khi đã tăng 1% trong năm 2024 và 4% trong năm 2023 [1]. Trong đó, *Penaeus vannamei* (tôm thẻ chân trắng) và *Penaeus monodon* (tôm sú) là hai loài nuôi chủ lực, chiếm khoảng 80% tổng sản lượng tôm nuôi toàn cầu [2]. Các quốc gia châu Á như Trung Quốc (1,2 triệu tấn, tăng 1,7%), Ấn Độ (1,0 triệu tấn, tăng 2%), Việt Nam, và Indonesia vẫn giữ vai trò trung tâm trong chuỗi cung ứng toàn cầu. Ecuador dẫn đầu khu vực Mỹ Latinh với 1,3 triệu tấn, tăng 3–4% so với năm trước. Đáng chú ý, sản lượng tôm sú toàn cầu dự kiến đạt 672.000 tấn trong năm 2025, tăng khoảng 7%, chủ yếu nhờ cải thiện giống và mở rộng nuôi ở Việt Nam và Ấn Độ [1]. Với giá trị kinh tế cao và nhu cầu xuất khẩu tăng, nghề nuôi tôm đã trở thành ngành công nghiệp chiến lược của nhiều quốc gia ven biển, đóng góp quan trọng vào an ninh lương thực, việc làm và tăng trưởng kinh tế toàn cầu.

Tuy nhiên, ngành nuôi tôm đang phải đối mặt với nhiều dịch bệnh nguy hiểm, trong đó bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV (White Spot Syndrome Virus) là một trong những mối đe dọa nghiêm trọng đối với nghề nuôi tôm trên toàn thế giới. WSSV là vi-rút có khả năng lây lan nhanh, gây chết hàng loạt trong thời gian ngắn [3]–[8]. WSSV được phát hiện lần đầu tiên tại Đài Loan vào năm 1992, sau đó lan sang Nhật Bản và hầu hết các quốc gia châu Á. Dịch bệnh này đã được ghi nhận tại nhiều quốc gia, bao gồm Trung Quốc, Ấn Độ, Malaysia, Indonesia và Thái Lan [9]. Ca nhiễm đầu tiên được chẩn đoán tại châu Mỹ ghi nhận vào năm 1995 ở một trang trại nuôi tôm tại miền Nam Texas. Tổng thiệt hại kinh tế do căn bệnh này gây ra được ước tính vào khoảng 8–15 tỷ USD, và con số này tiếp tục tăng thêm khoảng 1 tỷ USD mỗi năm, tương đương 10% sản lượng tôm toàn cầu [10], [11].

Sự hiện diện của vi-rút WSSV đã được ghi nhận ở các loài tôm đánh bắt tự nhiên gồm *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus semisulcatus* và *Penaeus penicillatus* được thu thập tại vùng ven biển phía nam Đài Loan (Bảng 1.1) [12]. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm WSSV ở *Penaeus monodon* (tôm sú) rất cao, 77,2%. Phát hiện này cho thấy WSSV không chỉ tồn tại trong các hệ thống nuôi trồng mà còn lưu hành trong môi trường tự nhiên, qua đó làm gia tăng nguy cơ lây lan dịch bệnh.

Bảng 1.1. Nhiễm tự nhiên vi-rút WSSV ở các loài giáp xác được thu thập từ vùng ven biển Đài Loan [12].

Tên khoa học	Phương pháp phát hiện				Tỷ lệ nhiễm phát hiện bằng PCR	
	H&E	TEM	<i>In situ</i>	PCR	Số mẫu dương tính WSSV / Tổng số mẫu xét nghiệm	(%)
<i>Tôm</i>						
<i>Penaeus monodon</i>	+	+	+	+	63/88	77,2
<i>Penaeus japonicus</i>	+	+	Nd	+	93/159	58,5
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Nd	Nd	Nd	+	2/32	6,2
<i>Penaeus penicillatus</i>	Nd	Nd	Nd	+	3/27	11,1
Nd: không xác định						

Những nỗ lực kiểm soát và quản lý WSSV đang gặp nhiều khó khăn do vi-rút có khả năng lây nhiễm cao, lây truyền nhanh và thiếu các phương pháp điều trị hiệu quả [13]. Tổ chức Sức khỏe Động vật Thế giới (OIE) xếp WSSV vào danh sách các bệnh vi-rút nguy hiểm đối với ngành nuôi tôm. Do đó, các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát sớm là hết sức cần thiết nhằm giảm nguy cơ mang mầm bệnh vào các trại nuôi [14]–[18].

Bên cạnh đó, việc phát hiện và chẩn đoán sớm WSSV đóng vai trò then chốt để thực hiện các chiến lược quản lý hiệu quả, góp phần ngăn chặn sự lây lan của vi-rút trong các vùng nuôi [19]. Trước những thách thức này, cộng đồng khoa học quốc tế đã đặc biệt quan tâm đến việc phát triển các thiết bị chẩn đoán sớm tại trang trại, hướng tới phát hiện nhanh, chính xác và kịp thời nhằm hạn chế thiệt hại do bệnh đốm trắng gây ra [20].

1.1.1.2. Tình hình bệnh WSSV ở Việt Nam

Việt Nam là quốc gia ven biển với đường bờ biển dài hơn 3.260 km, có vùng đặc quyền kinh tế rộng trên 1.000.000 km², cùng hai quần đảo Hoàng Sa, Trường Sa và hơn 3.000 đảo, quần đảo khác. Khoảng một nửa dân số sinh sống tại các tỉnh, thành phố ven biển, nơi có tiềm năng lớn để phát triển kinh tế biển, đặc biệt là nuôi trồng thủy sản. Trong đó, tôm nuôi nước lợ là một trong những đối tượng mang lại giá trị kinh tế cao và đóng vai trò chủ lực trong cơ cấu xuất khẩu thủy sản của Việt Nam. Tính đến chín tháng đầu năm 2025, sản lượng thủy sản nuôi trồng ước đạt 4.284,3 nghìn tấn, tăng 5,1% so với cùng kỳ năm trước; riêng sản lượng tôm thẻ chân trắng đạt 719,7 nghìn tấn, tăng 7,1% [21].

Bảng 1.2. Thiệt hại do vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam, năm 2015 [8].

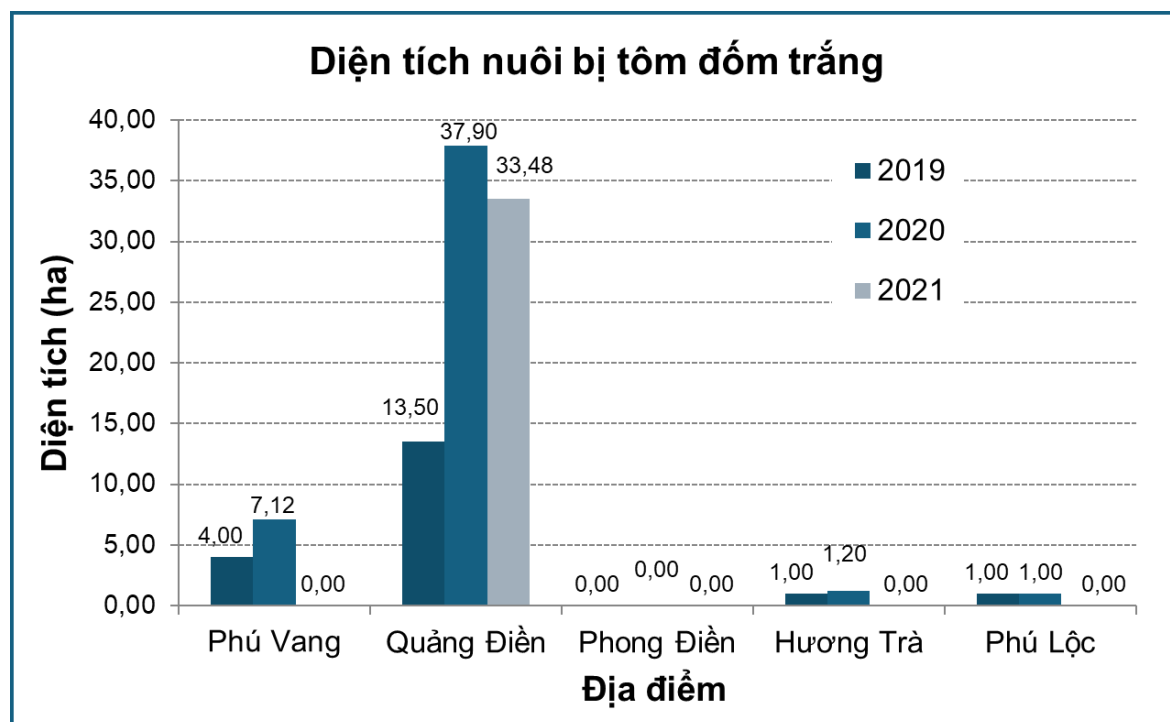
<i>Penaeus monodon</i>	<i>Penaeus vannamei</i>
3.447 ha bị ảnh hưởng	1.923 bị ảnh hưởng
Giả định	Giả định
38% nuôi bán thâm canh; 62% nuôi quảng canh	52,7% nuôi bán thâm canh; 47,3% nuôi quảng canh
2% hao hụt mỗi ngày trong giai đoạn 9–109 ngày sau thả giống	2% hao hụt mỗi ngày trong giai đoạn 9–109 ngày sau thả giống
Mật độ thả giống: 15 PL/m ² (bán thâm canh); 8 PL/m ² (quảng canh)	Mật độ thả giống: 100 PL/m ² (bán thâm canh); 70 PL/m ² (quảng canh)
Chu kỳ nuôi: 110 ngày	Chu kỳ nuôi: 110 ngày
Giá giống: 1.000 PL = 6,30 USD	Giá giống: 1.000 PL = 4,30 USD
Tăng 10% mỗi ngày về lượng thức ăn và tăng trưởng	Tăng 10% mỗi ngày về lượng thức ăn và tăng trưởng
Giá thức ăn: 1,5 USD/kg	Giá thức ăn: 1,3 USD/kg
Chi phí lao động: Khoảng 12,5% tổng sản lượng (5,77 USD/ha/ngày)	Chi phí lao động: Khoảng 12,5% tổng sản lượng (5,77 USD/ha/ngày)
Giá bán tại trại: 7,65 USD/kg	Giá bán tại trại: 3,83 USD/kg
Sản lượng thu hoạch: 2,74 tấn/ha (bán thâm canh); 1,5 tấn/ha (quảng canh)	Sản lượng thu hoạch: 12 tấn/ha (bán thâm canh); 9 tấn/ha (quảng canh)
Tổng thiệt hại ước tính: 3.250.775 USD	Tổng thiệt hại ước tính: 7.770.624 USD

Tại Việt Nam, tình hình dịch bệnh WSSV cũng diễn biến phức tạp, với những đợt bùng phát nghiêm trọng được ghi nhận từ năm 1993 đến nay. Bệnh đốm trắng được ghi nhận lần đầu vào năm 1993 và nhanh chóng lan rộng ở hầu hết các vùng nuôi tôm trọng điểm, Phú Yên, Khánh Hòa, Bà Rịa, Vũng Tàu và các tỉnh vùng đồng bằng sông Cửu Long, gây thiệt hại lớn về kinh tế [9]. Năm 1994, diện tích tôm bị bệnh lên đến 84.558 ha, ước thiệt hại khoảng 5.225 tấn, tương đương 294 tỷ đồng [22]. Giai đoạn 2011–2014, bệnh tiếp tục bùng phát mạnh, đặc biệt năm 2011, chỉ riêng khu vực đồng bằng sông Cửu Long đã có hơn 20.854 ha bị thiệt hại [2]. Các năm tiếp theo, diện tích nhiễm bệnh lần lượt tăng từ 8.109 ha (2012) lên 22.624 ha (2014) [3]. Bảng 1.2 trình bày mức thiệt hại do vi-rút WSSV gây ra tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam năm 2015. Các tính toán được thực hiện dựa trên những giả định đã được đưa ra, trong đó chỉ xét thiệt hại của một vụ nuôi đối với hai loài tôm là tôm sú và tôm thẻ chân trắng.

Do bệnh diễn biến bệnh phức tạp và chưa có biện pháp khắc phục hiệu quả, nhiều hộ nuôi buộc phải bỏ đầm hoặc chuyển đổi đối tượng nuôi. Ngày 24 tháng 3 năm 2021, Chính phủ đã ban hành Quyết định số 434/QĐ-TTg phê duyệt “Kế hoạch quốc gia phòng, chống một số dịch bệnh nguy hiểm trên thủy sản nuôi, giai đoạn 2021–2030”, trong đó bệnh đốm trắng được xếp vào nhóm bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi nước lợ cần ưu tiên phòng bệnh, khống chế và kiểm soát.

Tại khu vực miền Trung, đặc biệt là thành phố Huế, bệnh đốm trắng thường xuyên xuất hiện trên các vùng nuôi tôm sú và tôm thẻ chân trắng, nhất là ở các đầm phá Tam Giang, Cầu Hai thuộc Phú Vang và Quảng Điền. Nhiều năm liên tiếp, dịch bệnh đã gây thiệt hại đáng kể cho người nuôi. Trong giai đoạn 2019–2021, diện tích tôm bị nhiễm bệnh tại Quảng Điền dao động 13–38 ha, chiếm tỷ lệ đáng kể trong tổng diện tích nuôi của địa phương. Cụ thể, diện tích tôm bị bệnh lần lượt là 13,50 ha (năm 2019), 37,90 ha (năm 2020) và 33,48 ha (năm 2021) [23] (Hình 1.1). Do dịch bệnh thường xuyên xảy ra tại khu vực này, người nuôi tôm ở Quảng Điền có thói quen gửi mẫu tôm nghi nhiễm WSSV đến Trạm Chẩn đoán, Xét nghiệm và Điều trị bệnh động vật – Chi cục Chăn nuôi và Thú y Huế để phân tích. Các mẫu

tôm nhiễm WSSV được sử dụng trong các thí nghiệm của luận án được thu thập từ nguồn mẫu thực tế này, bảo đảm tính đại diện và tính ứng dụng của kết quả nghiên cứu.

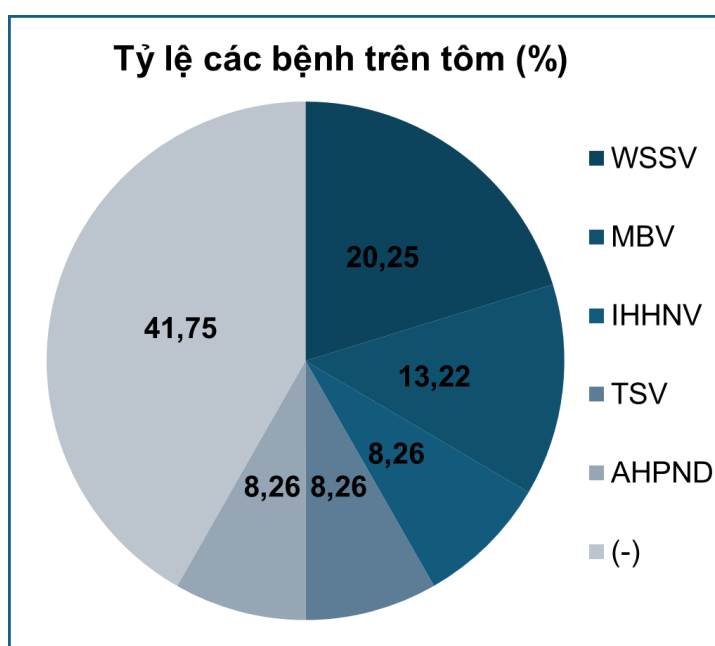


Hình 1.1. Thống kê tình hình bệnh các Phú Vang, Quảng Điền, Phong Điền, Hương Trà, Phú Lộc từ năm 2019 đến 2021.

Năm 2021, thành phố Huế, có diện tích nuôi trồng trên 5.368 ha, trong đó diện tích nuôi tôm là 1.639 ha với trữ lượng khoảng 1 tỷ con tôm giống, cùng số lượng lớn cua, cá và các loài khác. Tuy nhiên, từ cuối tháng 3 năm 2021, dịch bệnh bắt đầu bùng phát và lan rộng nhanh chóng. Trong năm này, có 76,74 ha vùng nuôi bị ảnh hưởng bởi dịch bệnh, trong đó bệnh đốm trắng là nguyên nhân chính, chiếm 33,48 ha, còn lại 43,26 ha bị tác động do yếu tố môi trường [24]. Như vậy, tỷ lệ diện tích nuôi tôm bị nhiễm bệnh do WSSV gây ra chiếm tới 43,62%.

Cũng trong năm 2021, các mẫu tôm và nước từ các ao bị nhiễm bệnh đã được thu thập để xét nghiệm năm loại bệnh chính: bệnh đốm trắng WSSV (White Spot Syndrome Virus), bệnh còi MBV (Monodon Baculovirus), bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô IHHNV (Infectious Hypodermal and

Hematopoietic Necrosis Virus), bệnh đuôi đỏ TSV (Taura Syndrome Virus), và bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease). Kết quả xét nghiệm được trả về trong vòng 24 giờ. Trong tổng số 242 mẫu được kiểm tra, có 49 mẫu dương tính với WSSV, 32 mẫu dương tính với MBV, 20 mẫu dương tính với IHHNV, 20 mẫu dương tính với TSV và 20 mẫu dương tính với AHPND [24]. Kết quả cho thấy WSSV chiếm tỷ lệ cao nhất, 20,25% (Hình 1.2). Sau khi xác định nguyên nhân, các ao, hồ và kênh rạch bị nhiễm bệnh được xử lý bằng hóa chất để tiêu diệt mầm bệnh. Hệ thống thoát nước của các ao nuôi tôm bị bệnh được đóng kín, đồng thời người dân xung quanh được thông báo để chủ động thực hiện các biện pháp phòng ngừa. Bên cạnh đó, cơ quan chức năng địa phương tăng cường công tác kiểm soát, giám sát môi trường vùng nuôi và kịp thời thông báo trên các phương tiện thông tin đại chúng.

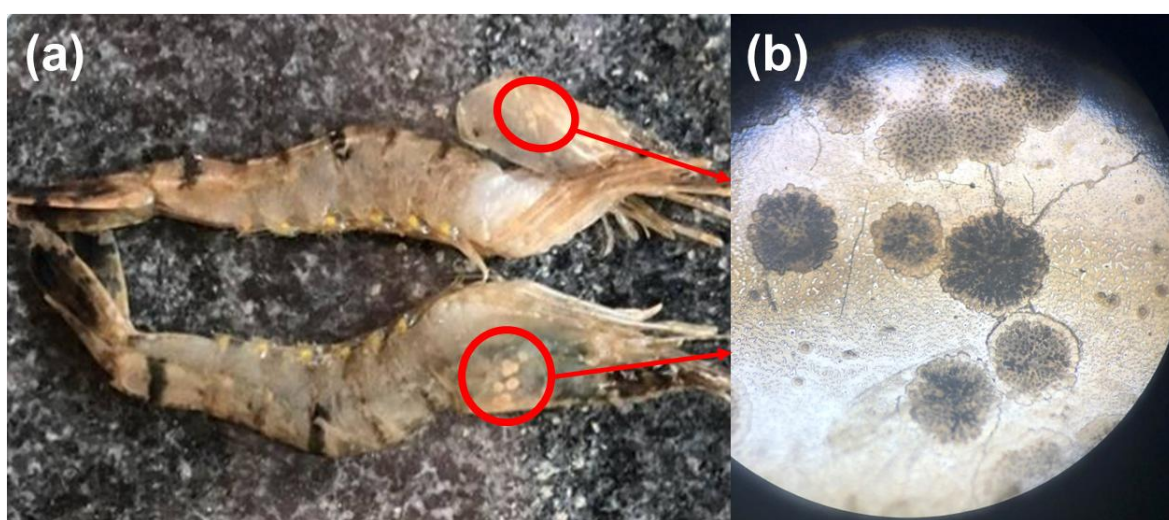


Hình 1.2. Tỷ lệ bệnh trên tôm tại Quảng Điền, Huế, năm 2021, WSSV chiếm tỷ lệ cao nhất 20,25%.

Những biểu hiện lâm sàng của bệnh được thể hiện rõ qua mẫu tôm thu thập tại xã Quảng An, huyện Quảng Điền vào tháng 4 năm 2022, khi tôm được thả nuôi được 45 ngày (mẫu từ Trạm Chẩn đoán, Xét nghiệm và Điều trị bệnh động vật – Chi cục Chăn nuôi và Thú y Huế) (Hình 1.3). Ở mẫu tôm này, phần vỏ đầu xuất

hiện nhiều đốm trắng lớn, dễ quan sát bằng mắt thường. Khi soi dưới kính hiển vi với vật kính 4×, các đốm trắng hiện rõ rệt. Giai đoạn từ tháng 3 đến tháng 5 là thời điểm giao mùa trong năm, thường là cao điểm xuất hiện dịch bệnh. Đợt bùng phát bệnh này đã gây thiệt hại hoàn toàn cho cả bốn ao nuôi của một hộ dân, mỗi ao có diện tích khoảng 5.000 m².

Như vậy, các quan sát thực tế và kết quả xét nghiệm đều khẳng định rằng WSSV vẫn là nguyên nhân chính gây chết hàng loạt trong vùng nuôi tôm ở Huế.



Hình 1.3. Tôm nhiễm WSSV với các đốm trắng đặc trưng trên vỏ: (a) Quan sát trên giáp đầu ngực; (b) Quan sát dưới kính hiển vi.

Theo Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn thành phố Huế, từ đầu năm đến tháng 11 năm 2023, do ảnh hưởng của điều kiện thời tiết và môi trường diễn biến phức tạp, dịch bệnh trên tôm đã phát sinh và lây lan trên diện rộng, gây thiệt hại lên đến hàng chục tỷ đồng. Thống kê cho thấy tổng diện tích ao nuôi tôm bị nhiễm bệnh trên toàn thành phố là 44 ha, trong đó có 16 ha bị bệnh đốm trắng và 28 ha bị ảnh hưởng do điều kiện môi trường. Các ao nuôi bị nhiễm bệnh tập trung chủ yếu tại các huyện có hoạt động nuôi tôm trọng điểm như Quảng Điền, Phong Điền và Phú Vang [25].

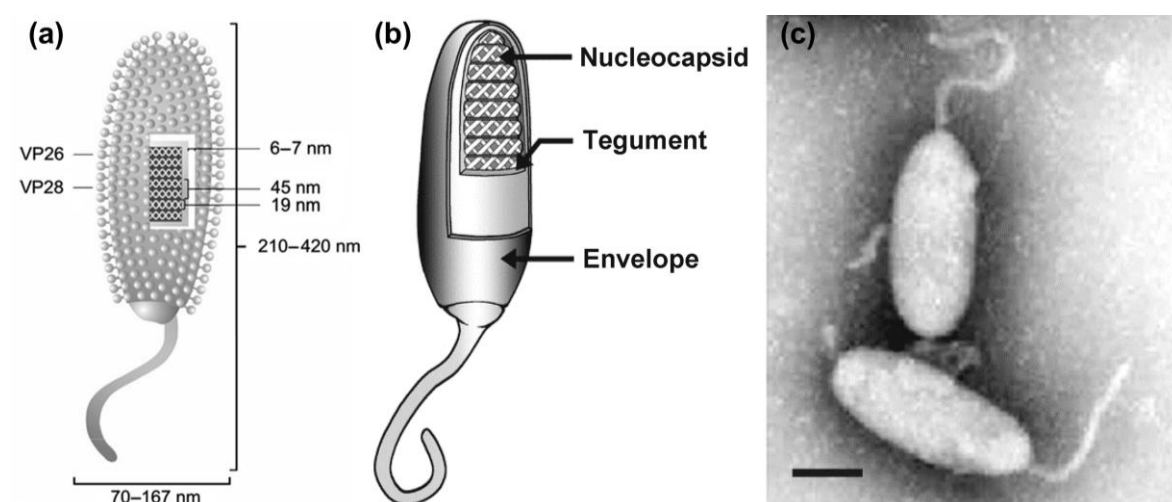
Từ các số liệu trên có thể thấy, bệnh đốm trắng vẫn đang là mối đe dọa nghiêm trọng đối với ngành nuôi tôm, không chỉ trên phạm vi toàn cầu mà còn tại

Việt Nam nói chung và thành phố Huế. Hiện nay, các phương pháp phát hiện bệnh chủ yếu dựa trên chẩn đoán lâm sàng thông qua quan sát triệu chứng và bệnh tích điển hình, hoặc kỹ thuật PCR trong phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, các phương pháp này còn nhiều hạn chế như phát hiện chậm, đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, kỹ thuật viên chuyên môn cao và thời gian trả kết quả kéo dài.

Trước thực trạng đó, việc nghiên cứu và phát triển các thiết bị chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút gây ra trên tôm nuôi nước lợ là hết sức cần thiết. Các thiết bị này có thể giúp phát hiện nhanh và kịp thời, góp phần kiểm soát sự lây lan, giảm thiểu thiệt hại và hướng tới phát triển ngành nuôi tôm bền vững trong bối cảnh biến đổi khí hậu và dịch bệnh ngày càng phức tạp.

1.1.2. Cấu trúc vi-rút WSSV và chỉ dấu đặc trưng-protein VP28

1.1.2.1. Cấu trúc vi-rút WSSV



Hình 1.4. Hình thái và cấu trúc vi-rút WSSV: (a) Hình thái tổng thể của vi-rút [26]; (b) Cấu trúc cắt dọc minh họa các lớp của vi-rút [27]; (c) Ảnh hiển vi điện tử TEM của vi-rút, thanh tỉ lệ = 100 nm [27].

Hình 1.4a và Hình 1.4c cho thấy cấu trúc của vi-rút WSSV có dạng elip, với một phần đuôi nhỏ kéo dài ở một đầu. Kích thước tổng thể của virion dao động trong khoảng 210–420 nm chiều dài và 70–167 nm đường kính. Về mặt cấu trúc, một virion hoàn chỉnh (Hình 1.4b) gồm ba thành phần chính [26]:

- Lớp màng ngoài Envelope: là một màng lipid kép có độ dày khoảng 6–7 nm, bao quanh toàn bộ vi-rút. Trên bề mặt màng bao có các protein cấu trúc chính, trong đó VP28 và VP26 là hai protein phổ biến nhất, chiếm khoảng 60% tổng lượng protein màng [28], [29]. VP28 đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu xâm nhập tế bào chủ, giúp vi-rút gắn và xâm nhập qua màng tế bào biểu mô. VP26 có thể hoạt động như một protein liên kết giữa màng bao và nucleocapsid, giúp ổn định cấu trúc virion.

- Lớp trung gian Tegument: Nằm giữa lớp màng ngoài và nucleocapsid, có độ dày 2–7,5 nm. Thành phần chủ yếu của lớp này là các protein có chức năng trung gian, tham gia vào quá trình lắp ráp, ổn định cấu trúc của virion.

- Lõi Nucleocapsid: Nucleocapsid có chiều dài 180–420 nm và đường kính 54–85 nm, chứa vật chất di truyền là DNA sợi đôi (dsDNA) được bao bọc bởi các protein capsid. Phân tích từ ảnh hiển vi điện tử TEM cho thấy nucleocapsid có cấu tạo gồm 15 vòng xoắn dọc theo trục dài của lõi, mỗi vòng gồm khoảng 13–15 capsomer.

Như vậy, cấu trúc của WSSV thể hiện đặc trưng của họ Nimaviridae, với lớp màng bao lipid kép, lớp protein trung gian, và nucleocapsid xoắn chứa DNA sợi đôi.

Vi-rút WSSV lây truyền chủ yếu thông qua hiện tượng ăn thịt các cá thể bị nhiễm bệnh hoặc qua nguồn nước đi qua mang. Ngoài ra, vi-rút còn có thể lây truyền theo chiều dọc từ tôm bố mẹ sang thế hệ con, thông qua trứng bị nhiễm nhưng không phát triển hoặc từ các tế bào hỗ trợ trong mô buồng trứng. Quá trình phiên mã mRNA của vi-rút, nhân đôi DNA hệ gen, hình thành nucleocapsid và lắp ráp các hạt virion hoàn chỉnh đều diễn ra trong nhân tế bào. Các protein của vi-rút được dịch mã trong bào tương [27].

1.1.2.2. Protein VP28

Các kháng thể đa dòng và đơn dòng đã được tạo ra chống lại các protein cấu trúc của WSSV, và được ứng dụng trong các công cụ chẩn đoán quan trọng. Vi-rút có thể bị vô hiệu hóa bởi huyết thanh chứa kháng thể kháng các protein cấu trúc

như VP12B, VP19, VP28, VP31, VP36A, VP33 (VP36B) và VP51 [30], [31]. Nhiều protein tái tổ hợp của WSSV đã được sử dụng làm vaccine phòng bệnh, trong đó các vaccine chứa VP19, VP26, VP28 và VP41A được chứng minh có thể cải thiện tỷ lệ sống sót của tôm sau khi nhiễm WSSV [32]. Từ đó có thể suy ra rằng các protein cấu trúc này, đặc biệt là VP28, có vai trò quan trọng trong quá trình nhận diện và đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với vi-rút WSSV.

VP28 được xem là một trong những chỉ dấu đặc hiệu và đáng tin cậy nhất cho sự hiện diện của WSSV, đồng thời là protein chủ đạo trong việc phát hiện vi-rút [33]. Các nghiên cứu cho thấy VP28 nằm ở bề mặt ngoài của màng bao, giúp dễ dàng tiếp cận trong các xét nghiệm phát hiện [34]. Mức độ biểu hiện cao của VP28 ở các cá thể bị nhiễm bệnh đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát triển các phương pháp phát hiện có độ nhạy cao, bao gồm các phản ứng miễn dịch và cảm biến sinh học [26], [28], [35].

Kháng thể chống lại VP28 đã được sử dụng làm đầu thu sinh học trong cảm biến miễn dịch điện hóa, cho phép phát hiện WSSV ngay cả ở nồng độ rất thấp, góp phần chẩn đoán và kiểm soát sớm dịch bệnh trong môi trường nuôi trồng thủy sản [20], [36], [37]. Do đó, việc phát triển các phương pháp phát hiện đặc hiệu và nhạy cao dựa trên VP28 là hết sức cần thiết để chẩn đoán sớm, giám sát dịch bệnh, chọn lọc giống kháng bệnh, kiểm tra nguồn nước và nâng cao hiệu quả quản lý nuôi trồng thủy sản cũng như hiểu biết về cơ chế gây nhiễm của WSSV.

1.2. Các phương pháp phát hiện WSSV hiện nay

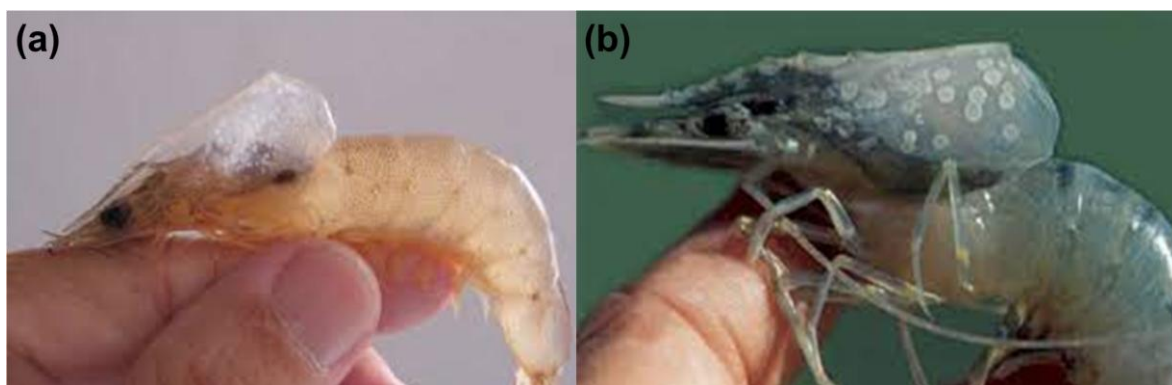
Việc nuôi tôm nước lợ được nhiều địa phương phát triển mạnh, đặc biệt là nhiều diện tích nuôi tôm truyền thống chuyển sang nuôi tôm bằng ao lót bạt, nuôi tôm 2, 3 giai đoạn, nuôi tôm ao nổi, góp phần tăng năng suất, chất lượng tôm nuôi. Trong suốt quá trình nuôi tôm, vấn đề quan trọng là phòng tránh tốt các tác nhân gây bệnh trên tôm, chẩn đoán sớm và theo dõi diễn biến bệnh để có các biện pháp xử lý kịp thời, tránh thiệt hại lớn về kinh tế.

Bệnh đốm trắng trên tôm nuôi nước lợ có thể bắt nguồn từ ba nhóm nguyên nhân chính: do vi-rút, do vi khuẩn, do môi trường. Các trường hợp này có biểu hiện bên ngoài tương tự nhau, khiến việc chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh trở nên khó khăn [38]:

- Do vi-rút: Xuất hiện nhiều đốm trắng bên trong vỏ, đặc biệt ở giáp đầu ngực, đốt bụng thứ 5–6; tôm bơi lờ đờ, bỏ ăn, đôi khi đỏ thân. Sau 3–10 ngày, tôm chết hàng loạt với tỷ lệ có thể đạt 100% (Hình 1.5).

- Do vi khuẩn gây hội chứng đốm trắng BWSS (Bacterial White Spot Syndrome): Tôm vẫn ăn và lột vỏ bình thường, đốm trắng có thể mất sau khi lột, quá trình phát triển chậm, tỷ lệ chết rải rác.

- Do môi trường: Đốm trắng xuất hiện trên vỏ nhưng tôm vẫn hoạt động bình thường, không tấp bờ, tốc độ sinh trưởng giảm nhẹ.



Hình 1.5. Biểu hiện nhiễm vi-rút đốm trắng WSSV trên tôm nuôi nước lợ: (a) Tôm thẻ chân trắng; (b) Tôm sú [38].

Trong ba nhóm nguyên nhân này, bệnh do vi-rút WSSV là nguy hiểm nhất, gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm cả về sản lượng và kinh tế. Do đó, việc phát hiện và xác định chính xác WSSV có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong công tác phòng, chống dịch bệnh. Hiện nay, các phương pháp phát hiện WSSV được chia thành hai nhóm chính [38]:

- Chẩn đoán lâm sàng: Dựa trên triệu chứng và bệnh tích điển hình quan sát được ở tôm bệnh. Phương pháp này nhanh, nhưng không xác định được chính xác tác nhân gây bệnh, nên chỉ mang tính định hướng ban đầu.

- Chẩn đoán phòng thí nghiệm: Bao gồm các kỹ thuật phân tích và xét nghiệm nhằm phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp sự hiện diện của WSSV với độ chính xác cao, thường được thực hiện tại các trung tâm nghiên cứu hoặc phòng thí nghiệm thủy sản, và có thể chia thành hai hướng chính:

+ (i) Các phương pháp dựa trên quan sát hình thái học và mô bệnh học: nhuộm mô H&E, kính hiển vi điện tử TEM (Transmission Electron Microscopy), hoặc lai tại chỗ ISH (In Situ Hybridization);

+ (ii) Các phương pháp sinh học phân tử và miễn dịch học: phản ứng chuỗi polymerase PCR (Polymerase Chain Reaction) và các xét nghiệm miễn dịch ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Western Blot, FTA (Flow Through Assay) hoặc que thử nhanh.

Ở Việt Nam, thu mẫu thực, xét nghiệm bằng phương pháp sinh học phân tử PCR được sử dụng làm tiêu chuẩn trong phát hiện WSSV, theo Quyết định 117/QĐ-TY-TS về Tiêu chuẩn cơ sở quy trình phát hiện vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) ở tôm, Cục Thú y ban hành ngày 23 tháng 02 năm 2018. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu thiết bị hiện đại, kỹ thuật viên chuyên môn cao và không thể thực hiện tại hiện trường, khiến người nuôi khó đưa ra biện pháp xử lý kịp thời, dẫn đến thiệt hại đáng kể khi dịch bệnh bùng phát.

1.2.1. Phương pháp truyền thống

1.2.1.1. Chẩn đoán lâm sàng

Chẩn đoán lâm sàng là bước đầu tiên trong quy trình phát hiện bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV, giúp người nuôi hoặc kỹ thuật viên nhận diện nhanh các dấu hiệu nghi nhiễm trước khi tiến hành các xét nghiệm xác nhận bằng phương pháp sinh học phân tử hoặc miễn dịch học. Việc quan sát biểu hiện bên ngoài và hành vi

của tôm có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá sớm tình trạng sức khỏe quần đàn và khoanh vùng mầm bệnh.

Tôm bị nhiễm vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV thường xuất hiện các đốm trắng có đường kính từ 0,5–3,0 mm trên vỏ kitin, phụ bộ và dưới biểu bì. Tuy nhiên, các đốm trắng này không phải lúc nào cũng xuất hiện, và những biểu hiện tương tự cũng có thể bắt nguồn từ nhiễm khuẩn, độ kiềm cao hoặc môi trường không ổn định, nên không được xem là dấu hiệu chẩn đoán đáng tin cậy cho bệnh đốm trắng.

Ngoài ra, các triệu chứng lâm sàng khác của bệnh bao gồm tôm bơi lơ đờ, giảm ăn đột ngột, thân và phụ bộ chuyển sang màu đỏ, vỏ trở nên mềm và dễ bong tróc [26]. Những biểu hiện này thường xuất hiện trong giai đoạn cấp tính của bệnh, giúp xác định sơ bộ tôm nghi nhiễm WSSV và đưa ra quyết định lấy mẫu kịp thời để xét nghiệm bằng các kỹ thuật chuyên sâu như PCR, ELISA hoặc test nhanh miễn dịch.

1.2.1.2. Phương pháp mô bệnh học

Phương pháp mô bệnh học được sử dụng để quan sát các biến đổi đặc trưng trong cấu trúc mô của tôm nhiễm vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV, thông qua kỹ thuật nhuộm H&E (Hematoxylin và Eosin). Dưới kính hiển vi quang học, các tế bào biểu mô của vỏ kitin, mang, mô liên kết dưới vỏ, tuyến râu, cơ quan bạch huyết và mô tạo máu cho thấy nhân tế bào phì đại rõ rệt, nhiễm sắc chất bị đẩy ra ngoại vi, cùng sự hình thành thể vùi trong nhân kiểu CAI (Cowdry type A) là dấu hiệu điển hình của bệnh WSSV. Các thể vùi này có thể bắt màu đỏ hồng (ura acid) ở giai đoạn sớm và xanh tím (ura base) ở giai đoạn muộn, thường chỉ xuất hiện một thể vùi trong mỗi nhân tế bào.

Phương pháp mô bệnh học có giá trị cao trong chẩn đoán sơ bộ và điều tra dịch tễ học, giúp nhận diện nhanh các tổn thương điển hình ở mô đích. Tuy nhiên, do độ nhạy không cao và có thể nhầm lẫn với các bệnh do vi-rút khác như IHHNV,

HPV hoặc MBV, kỹ thuật này thường được kết hợp với phản ứng lai tại chỗ (ISH) hoặc PCR để khẳng định chính xác sự hiện diện của WSSV.

1.2.1.3. Phương pháp kính hiển vi điện tử TEM

Kỹ thuật hiển vi điện tử truyền qua TEM (Transmission Electron Microscopy) cho phép quan sát trực tiếp hình thái siêu cấu trúc của vi-rút WSSV trong nhân tế bào bị nhiễm. Trong các tế bào nhiễm nặng, virion phân bố dày đặc trong nhân phì đại, phần lớn bị cắt dọc theo trục dài, chỉ một số ít thể hiện hình elip hoàn chỉnh với cấu trúc đặc trưng của vi-rút.

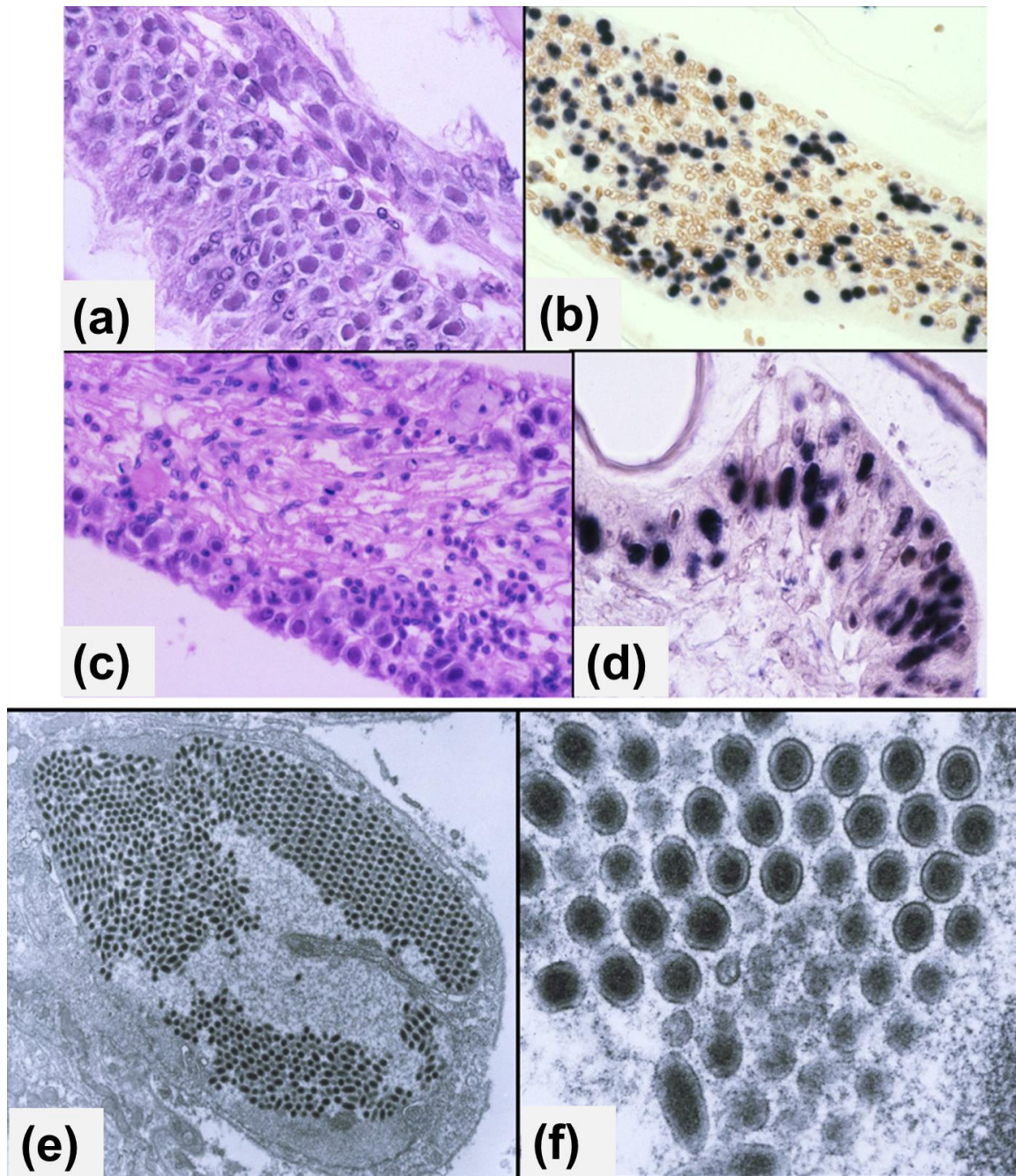
Phương pháp TEM có độ đặc hiệu rất cao, giúp khẳng định trực tiếp hình thái và sự hiện diện của WSSV, đồng thời giải thích tín hiệu lai dương tính mạnh trong phương pháp ISH. Tuy nhiên, do yêu cầu thiết bị đắt tiền, quy trình chuẩn bị mẫu phức tạp và thời gian phân tích lâu, TEM không phù hợp cho chẩn đoán đại trà, mà chủ yếu được sử dụng trong nghiên cứu chuyên sâu hoặc xác nhận kết quả mô bệnh học.

1.2.1.4. Phương pháp lai tại chỗ ISH

Phương pháp lai tại chỗ ISH (In Situ Hybridization) được sử dụng để phát hiện trực tiếp DNA đặc trưng của WSSV trong mô bị nhiễm. Kỹ thuật này sử dụng đầu dò DNA được đánh dấu bằng digoxigenin (DIG) lai với trình tự gen đặc hiệu của WSSV. Khi phản ứng lai xảy ra, các nhân tế bào chứa DNA vi-rút hiện rõ màu xanh–đen đậm, trên nền mô được phản nhuộm bằng Bismarck Brown nhằm tăng độ tương phản hình ảnh.

Phương pháp ISH vừa cung cấp thông tin mô học về vị trí tổn thương, vừa xác định mức độ và phạm vi nhiễm vi-rút trong từng vùng mô đích, qua đó cho phép đánh giá trực quan mật độ vi-rút trong tế bào. Với độ đặc hiệu và độ tin cậy cao, ISH được xem là phương pháp chẩn đoán xác định đối với WSSV, thường được sử dụng để xác nhận kết quả từ mô bệnh học hoặc PCR.

Tuy nhiên, phương pháp này có chi phí cao và thời gian thực hiện dài hơn, do đó thường được áp dụng trong nghiên cứu khoa học, kiểm chứng mẫu mô hoặc đánh giá kết quả nhiễm thực nghiệm.



Hình 1.6. Mô bệnh học của bệnh đốm trắng trên tôm thẻ chân trắng được quan sát bằng (a) nhuộm H&E; (b) lai tại chỗ ISH; (c) nhuộm H&E; (d) lai tại chỗ ISH; (e) và (f) kính hiển vi điện tử TEM [39].

Hình 1.6 minh họa tiến trình quan sát bệnh đốm trắng ở tôm thẻ chân trắng ở ba cấp độ. Ở mức mô học H&E, các tế bào biểu mô và mô liên kết cho thấy đặc điểm điển hình của nhiễm WSSV với nhân phì đại và thể vùi trong nhân kiểu Cowdry type A. Kết quả lai tại chỗ ISH xác nhận sự hiện diện đặc hiệu của DNA vi-rút bằng tín hiệu dương tính mạnh (màu xanh đen đậm) trong nhân tế bào. Ảnh TEM cung cấp bằng chứng trực tiếp về cấu trúc hạt vi-rút WSSV với lớp vỏ bao ngoài và lớp nhân đặc trung tâm (nucleocapsid), khẳng định mật độ vi-rút cao trong nhân của tế bào nhiễm.

1.2.2. Phương pháp PCR

Phản ứng chuỗi polymerase PCR (Polymerase Chain Reaction) là phương pháp phát hiện bệnh có độ chính xác và độ nhạy cao, hiện được sử dụng phổ biến nhất trong chẩn đoán vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV [40], [41]. Phương pháp này cho phép phát hiện trực tiếp trình tự gen đặc trưng của WSSV, đồng thời có thể mở rộng để định lượng tải lượng vi-rút tùy theo biến thể kỹ thuật được sử dụng. Một số dạng PCR thường áp dụng trong chẩn đoán WSSV gồm:

- PCR cổ điển (Conventional PCR): phát hiện sự có mặt của trình tự gen đặc trưng của WSSV với độ nhạy cao, tuy nhiên chỉ mang tính định tính.
- Nested PCR: sử dụng hai cặp mồi kế tiếp nhau để khuếch đại đặc hiệu hơn, nhờ đó tăng độ nhạy và có thể phát hiện lượng vi-rút rất thấp (khoảng 10^2 bản sao).
- PCR thời gian thực (Real-time PCR hoặc qPCR): cho phép định lượng tải lượng vi-rút trong mẫu, cung cấp kết quả nhanh, chính xác và được Tổ chức Thú y Thế giới (OIE) khuyến nghị sử dụng trong giám sát và kiểm soát dịch bệnh thủy sản.

1.2.3. Phương pháp miễn dịch học

1.2.3.1. Phương pháp ELISA

Phương pháp ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bắt giữ kháng nguyên (Antigen-Capture ELISA) là một kỹ thuật miễn dịch học định lượng dựa trên tương tác đặc hiệu giữa kháng nguyên VP28 của vi-rút gây hội chứng đốm

trắng WSSV và kháng thể đơn dòng MAb (Monoclonal Antibody). Trong kỹ thuật này, kháng thể đặc hiệu VP28 được cố định trên đĩa vi giếng để bắt giữ protein VP28 có trong mẫu tôm nhiễm bệnh, sau đó kháng thể thứ cấp liên hợp enzyme HRP được sử dụng để tạo tín hiệu màu.

Hệ thống capture ELISA được phát triển bằng cách kết hợp kháng thể đơn dòng 6E1 (đặc hiệu với VP28) làm kháng thể bắt giữ và kháng thể đa dòng tinh sạch từ huyết thanh chuột làm kháng thể phát hiện. Kỹ thuật này cho phép định lượng trực tiếp WSSV trong mẫu huyết tôm (haemolymph) mà không cần tinh sạch vi-rút trước đó. Độ nhạy và độ tuyến tính cao được ghi nhận trong khoảng nồng độ 5,00–42,40 ng/ μ L, với khả năng phát hiện sự gia tăng protein VP28 từ 5,2 ng/ μ L lên 14,4 ng/ μ L trong sáu ngày sau khi gây nhiễm, tương ứng với tỷ lệ chết tích lũy đạt 70% [42].

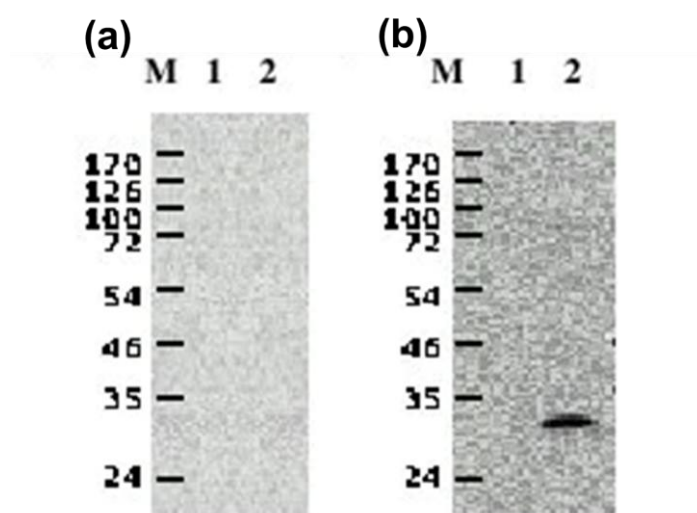
Ngoài ra, các nghiên cứu khác cũng ghi nhận rằng việc sử dụng hỗn hợp kháng thể đơn dòng đặc hiệu với VP19 (W25-8D) và VP28 (W29) giúp tăng độ nhạy phát hiện lên gấp đôi so với dùng riêng lẻ từng kháng thể, cho phép phát hiện WSSV ở mức nồng độ thấp tới 20 pg VP28. Mặc dù độ nhạy vẫn thấp hơn so với kỹ thuật PCR, ELISA có ưu điểm nổi bật là dễ thực hiện, chi phí hợp lý, cho phép phân tích định lượng và sàng lọc hàng loạt tại phòng thí nghiệm, đồng thời thể hiện tiềm năng ứng dụng trong giám sát dịch bệnh trên diện rộng [43].

1.2.3.2. Phương pháp Western Blot

Kỹ thuật Western Blot cho phép xác định trực tiếp protein VP28 của WSSV trong mẫu tôm bằng cách tách các protein trên gel SDS-PAGE và chuyển chúng lên màng nitrocellulose, sau đó sử dụng kháng thể đặc hiệu VP28 để phát hiện. Các kháng thể đơn chuỗi scFv được tạo ra từ thư viện hiển thị phage có khả năng nhận biết các epitope tuyến tính của VP28, đặc biệt ở vùng axit amin 28–67, 87–93 và 171–204, tương ứng với các vùng kháng nguyên mạnh trên protein này. Kết quả Western Blot cho thấy các kháng thể scFv như P108D2, P108B4, P111B10 và P157D8 phản ứng đặc hiệu với protein VP28 đã biến tính, chứng minh khả năng

ứng dụng của kỹ thuật này trong việc xác định chính xác vị trí epitope và phục vụ phát triển các hệ phát hiện miễn dịch có độ đặc hiệu cao [44].

Hình 1.7 minh họa kết quả Western Blot xác nhận tính đặc hiệu của kháng thể kháng VP28 (ab26935). Hình 1.7a là huyết thanh trước miễn dịch (pre-bleed serum) không xuất hiện băng protein tại vị trí khoảng 28-30 kDa, cho thấy huyết thanh này không chứa kháng thể nhận biết VP28. Ngược lại, ở Hình 1.7b là huyết thanh sau miễn dịch (anti-serum), xuất hiện một băng rõ nét ở vùng khoảng 28-30 kDa trong mẫu chứa protein VP28, chứng tỏ kháng thể đã nhận diện đặc hiệu protein VP28 tái tổ hợp.



Hình 1.7. Kết quả Western Blot xác nhận tính đặc hiệu của kháng thể kháng VP28 [45].

1.2.3.3. Phương pháp FTA

Phương pháp FTA (Flow Through Assay) là một kỹ thuật miễn dịch học nhanh dựa trên phản ứng kháng nguyên–kháng thể đặc hiệu, được phát triển nhằm phát hiện protein VP28 của vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV). Trong phương pháp này, kháng thể đơn dòng MAb được cố định trên màng nitrocellulose để bắt giữ kháng nguyên vi-rút có trong mẫu, sau đó tạo tín hiệu màu nhờ phản ứng enzyme hoặc hạt vàng. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng việc sử dụng hỗn hợp kháng thể đơn dòng (MAb cocktail) trong phép thử FTA giúp tăng đáng kể độ nhạy

phát hiện. Cụ thể, tổ hợp kháng thể C-05 + C-56 và C-14 + C-56 cho khả năng phát hiện WSSV cao gấp 100 lần so với PCR một bước và gần tương đương với PCR hai bước, đồng thời có thể thực hiện nhanh tại hiện trường mà không cần thiết bị phức tạp [46].

1.2.3.4. Phương pháp test nhanh miễn dịch sắc ký ICTS

Phương pháp test nhanh miễn dịch sắc ký ICTS (Immunochromatographic Test Strip) sử dụng cơ chế phản ứng kháng nguyên–kháng thể đặc hiệu giữa protein VP28 và kháng thể đơn dòng W29, được gắn với hạt vàng keo (colloidal gold) để tạo tín hiệu màu. Khi mẫu chứa WSSV được cho chảy qua màng nitrocellulose, phức hợp kháng nguyên–kháng thể tạo ra vạch đỏ-tím tại vùng thử nghiệm (T-line), vùng kiểm soát (C-line) hiển thị khi phản ứng diễn ra đúng. Bộ kit này có thể phát hiện mẫu dương tính ở tỉ lệ pha loãng 1:50, cho kết quả rõ ràng trong vòng 15 phút mà không cần thiết bị phòng thí nghiệm. Mặc dù độ nhạy thấp hơn PCR khoảng 2 triệu lần, test strip có ưu điểm vượt trội về tốc độ, tính tiện dụng, khả năng bảo quản tới 2 năm ở nhiệt độ phòng, phù hợp cho kiểm tra nhanh tại trại nuôi hoặc cơ sở sản xuất giống [47].

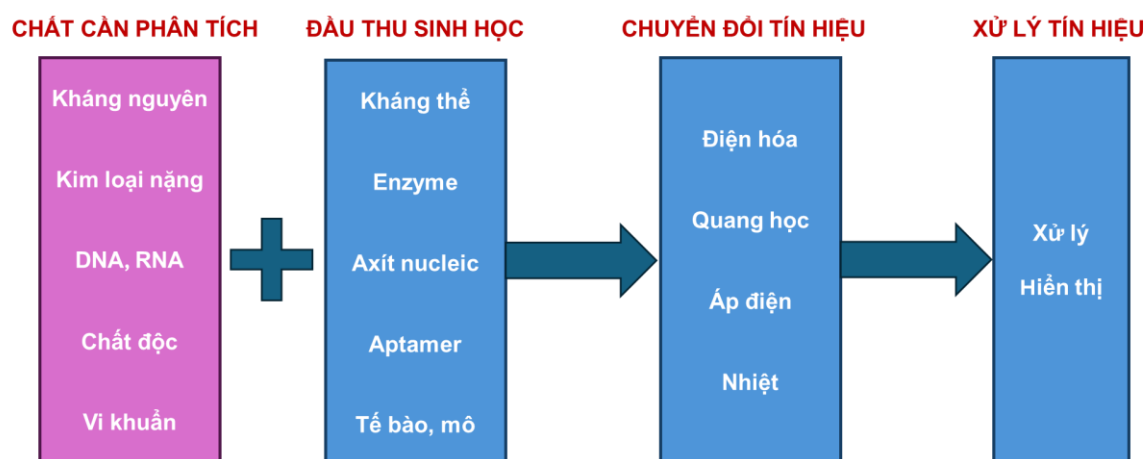
1.2.4. Phương pháp cảm biến sinh học điện hoá

Mặc dù PCR là phương pháp phổ biến cho độ chính xác cao, phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật viên chuyên nghiệp và trang thiết bị hiện đại, thường ở xa trang trại. Do đó, nhu cầu phát triển các phương pháp phát hiện nhanh, chi phí hợp lý và dễ sử dụng đang ngày càng được quan tâm trong lĩnh vực giám sát dịch bệnh thủy sản.

Một trong những hướng tiếp cận đầy triển vọng là cảm biến sinh học. Cảm biến sinh học là hệ thống phân tích kết hợp giữa thành phần nhận biết sinh học và bộ chuyển đổi tín hiệu. Khi xảy ra sự tương tác đặc hiệu giữa đối tượng cần phát hiện và phân tử nhận biết sinh học, sự thay đổi trên bề mặt điện cực sẽ được chuyển thành tín hiệu có thể ghi nhận và xử lý. Tùy thuộc vào cơ chế chuyển đổi tín hiệu, cảm biến sinh học có thể được phân thành nhiều nhóm như cảm biến điện hóa,

quang học, áp điện và nhiệt. Nhờ khả năng tích hợp với các nền tảng điện tử và hệ thống xử lý dữ liệu, công nghệ này đang được nghiên cứu rộng rãi nhằm phát triển các thiết bị phân tích nhanh phục vụ chẩn đoán, giám sát môi trường và kiểm soát chất lượng trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

1.2.4.1. Cảm biến sinh học

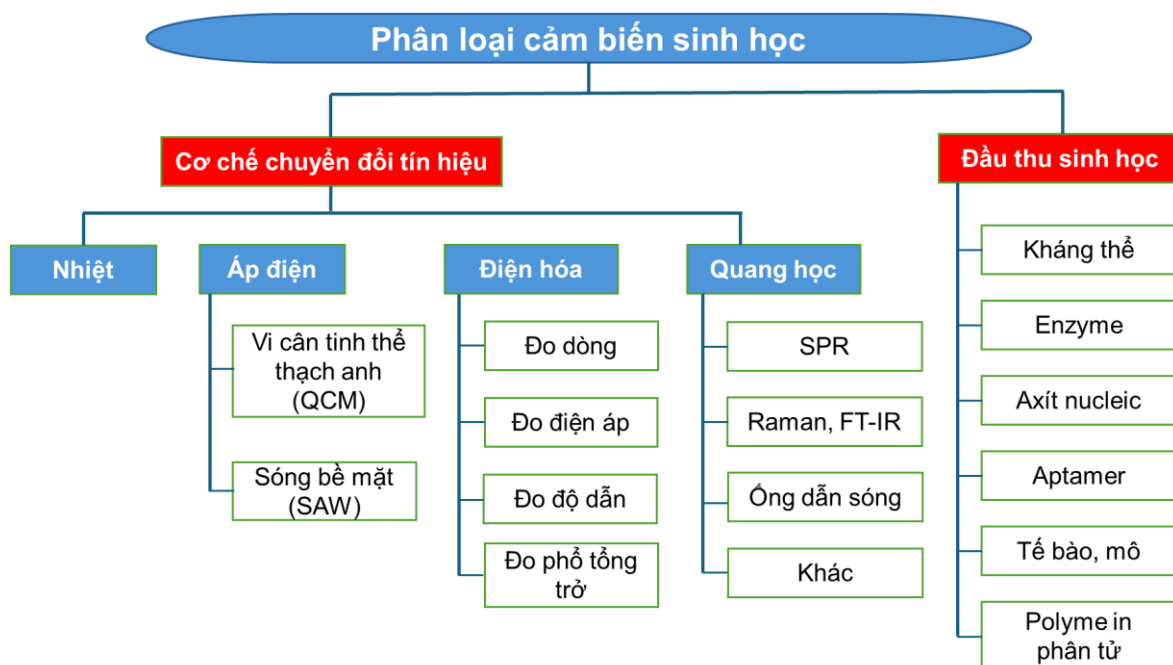


Hình 1.8. Cấu trúc của cảm biến sinh học.

Cảm biến sinh học (biosensor) là một thiết bị tích hợp có khả năng xác định và định lượng chất phân tích dựa trên phản ứng đặc hiệu giữa đầu thu sinh học và chất cần phân tích, trong đó tín hiệu sinh học được chuyển đổi thành tín hiệu đo được thông qua bộ phận chuyển đổi [48]. Về cấu tạo, một cảm biến sinh học điển hình gồm ba thành phần chính (Hình 1.8):

- Đầu thu sinh học (bioreceptor): nhận biết đặc hiệu đối tượng phân tích, có thể là enzyme, kháng thể, DNA hoặc tế bào.
- Bộ phận chuyển đổi (transducer): chuyển đổi tín hiệu sinh học thành tín hiệu điện, quang, áp điện hoặc nhiệt.
- Bộ phận xử lý và hiển thị (signal processor): khuếch đại, xử lý và hiển thị kết quả đo lường.

Tùy thuộc vào nguyên lý hoạt động và thành phần nhận biết sinh học, cảm biến sinh học được chia thành nhiều nhóm khác nhau. Hình 1.9 trình bày sơ đồ phân loại cảm biến sinh học dựa trên cơ chế chuyển đổi tín hiệu và loại đầu thu sinh học.



Hình 1.9. Phân loại cảm biến sinh học dựa trên cơ chế chuyển đổi tín hiệu và loại đầu thu sinh học.

- Về cơ chế chuyển đổi tín hiệu, cảm biến được chia thành bốn nhóm chính:

- + Cảm biến nhiệt: dựa trên sự thay đổi nhiệt độ sinh ra từ phản ứng sinh học.
- + Cảm biến áp điện: sử dụng dao động cơ học của tinh thể như QCM (Quartz Crystal Microbalance) hoặc SAW (Surface Acoustic Wave) để phát hiện thay đổi khối lượng trên bề mặt điện cực.
- + Cảm biến điện hóa: bao gồm các phương pháp đo dòng, đo điện áp, đo độ dẫn và phổ tổng trở điện hóa nhằm ghi nhận tín hiệu điện do tương tác sinh học gây ra.

+ Cảm biến quang học: phát hiện sự thay đổi tín hiệu quang học thông qua các kỹ thuật như SPR (Surface Plasmon Resonance), Raman, FT-IR, hoặc ống dẫn sóng quang học.

- Về đầu thu sinh học, cảm biến có thể sử dụng nhiều loại vật liệu nhận biết khác nhau như kháng thể, enzyme, axit nucleic, aptamer, tế bào hoặc mô sinh học, và polyme in phân tử, tùy theo đối tượng và mục đích phân tích.

Trong đó, cảm biến sinh học điện hóa được hướng đến ứng dụng trong phát triển thiết bị do tính đơn giản trong các bước phân tích, độ nhạy cao, tính di động và chi phí hợp lý [49]–[53]. Cảm biến này mang lại những ưu điểm về độ nhạy, độ đặc hiệu và thời gian ngắn để theo dõi sự lây lan của bệnh trong quá trình nuôi tôm và xét nghiệm WSSV trong nước, trước khi thả giống [37], [54].

1.2.4.2. Cảm biến sinh học điện hóa

Cảm biến sinh học điện hóa là cảm biến sinh học trong đó sự tương tác giữa đối tượng cần phân tích và thành phần nhận biết sinh học được chuyển đổi thành tín hiệu điện thông qua hệ điện hóa. Các tín hiệu đo được bao gồm dòng điện, điện thế, độ dẫn điện và tổng trở điện hóa [48], [55]. Thành phần nhận biết sinh học (bioreceptor) có thể là kháng thể, enzyme, ssDNA, tế bào hoặc vi sinh vật, tùy theo mục đích ứng dụng. Loại cảm biến này nổi bật nhờ độ nhạy cao, thời gian đáp ứng nhanh, độ chọn lọc tốt và được ứng dụng rộng rãi trong phân tích y sinh, công nghệ thực phẩm và giám sát môi trường [56].

Hầu hết cảm biến điện hóa được thiết kế dựa trên cấu hình ba điện cực, bao gồm:

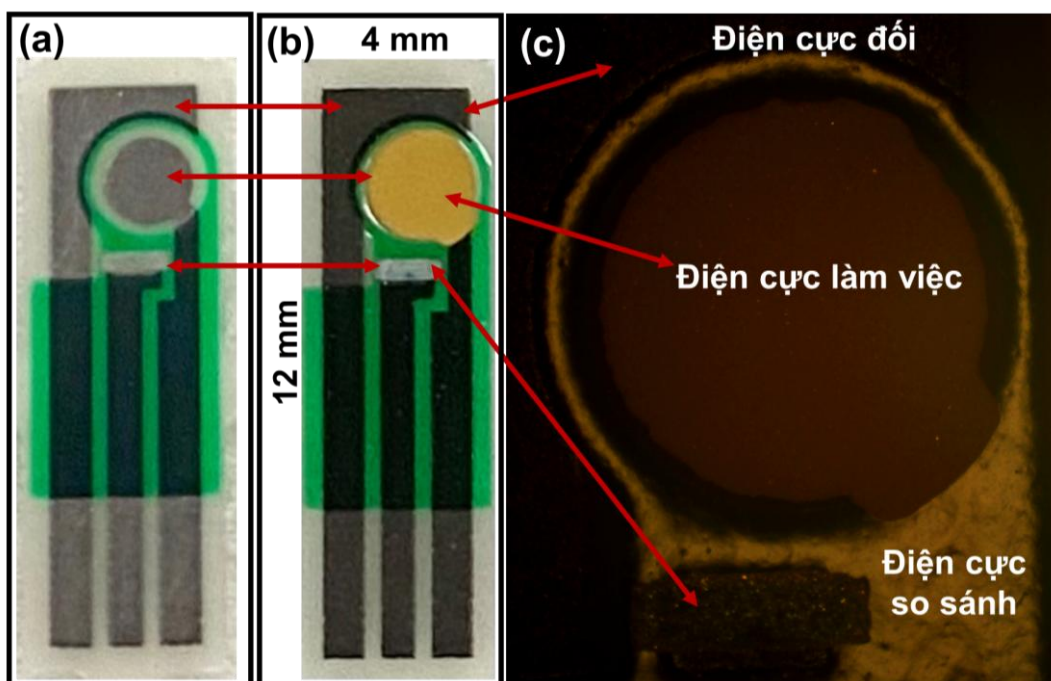
- Điện cực làm việc (WE – Working Electrode): nơi diễn ra các phản ứng sinh học và điện hóa, đóng vai trò quan trọng nhất trong cảm biến.

- Điện cực so sánh (RE – Reference Electrode): duy trì thế ổn định trong quá trình đo.

- Điện cực đối (CE – Counter Electrode): hoàn tất mạch điện bằng cách cung cấp hoặc nhận dòng điện.

Vật liệu chế tạo điện cực làm việc thường là kim loại quý (vàng, bạc, platin) hoặc cacbon. Các điện cực kim loại có độ dẫn cao và khả năng cố định đầu thu sinh học tốt, nhưng dễ xảy ra phản ứng phụ với tạp chất trong dung dịch. Ngược lại, điện cực cacbon (như GCE – Glassy Carbon Electrode) có tính trơ hóa học, dòng nền thấp, chi phí rẻ và tương thích sinh học tốt, song cần đánh bóng và xử lý bề mặt trước khi sử dụng.

Điện cực in lưới SPE (Screen-Printed Electrode) đang là xu hướng phát triển ứng dụng trong cảm biến điện hóa trong những năm gần đây. Công nghệ này sử dụng mực in chứa vật liệu dẫn điện (cacbon, vàng, platin, Ag/AgCl) được nén qua khuôn mẫu lên đế gốm hoặc nhựa, sau đó xử lý nhiệt để tạo liên kết bền vững giữa lớp mực và đế. Ưu điểm nổi bật của SPE là chi phí hợp lý, khả năng sản xuất hàng loạt, thiết kế linh hoạt và độ lặp lại cao.



Hình 1.10. Các điện cực in lưới sử dụng trong luận án: (a) điện cực SPCE với điện cực làm việc cacbon; (b) điện cực SPAuE với điện cực làm việc vàng; (c) Ảnh hiển vi cấu trúc ba điện cực.

Điện cực in lưới thường có cấu hình ba điện cực tích hợp trên cùng một đế, với kích thước nhỏ gọn, cấu trúc phẳng, và yêu cầu lượng mẫu rất nhỏ. Các điện cực này được ứng dụng rộng rãi trong cảm biến sinh học điện hóa nhờ khả năng đo nhiều loại tín hiệu như cường độ dòng, điện thế hoặc phổ tổng trở điện hóa. Đặc biệt, điện cực in lưới thường được thiết kế dùng một lần nhằm đảm bảo độ sạch bề mặt, tránh nhiễm chéo và giảm sai số giữa các phép đo, đồng thời đơn giản hóa quy trình thí nghiệm trong các ứng dụng phân tích sinh học.

Hình 1.10 minh họa các điện cực in lưới (BioDevice Technology, Nhật Bản) sử dụng trong luận án. Hình 1.10a thể hiện điện cực SPCE (Screen-Printed Carbon Electrode) với điện cực làm việc bằng cacbon, diện tích $2,64 \text{ mm}^2$. Hình 1.10b là điện cực SPAuE (Screen-Printed Gold Electrode) với điện cực làm việc phủ vàng, diện tích $3,67 \text{ mm}^2$. Cả hai loại điện cực đều được tích hợp ba điện cực gồm: điện cực làm việc, điện cực đối và điện cực so sánh, được in đồng thời trên cùng một đế nhựa cách điện, tạo nên cấu trúc nhỏ gọn, thuận tiện cho các phép đo điện hóa. Hình 1.10c là ảnh hiển vi cho thấy rõ bố trí ba điện cực: điện cực làm việc ở trung tâm, điện cực đối bao quanh và điện cực so sánh Ag/AgCl nằm phía dưới, tạo nên một hệ điện cực hoàn chỉnh cho quá trình đo CV, SWV và EIS trong cảm biến sinh học điện hóa.

SPCE và SPAuE là cảm biến điện hóa dùng một lần, đặc tính điện hóa của chúng đã được chứng minh là có hiệu quả đối với các ứng dụng phát hiện protein, mang lại sự đơn giản, độ nhạy và độ lặp lại cao [57].

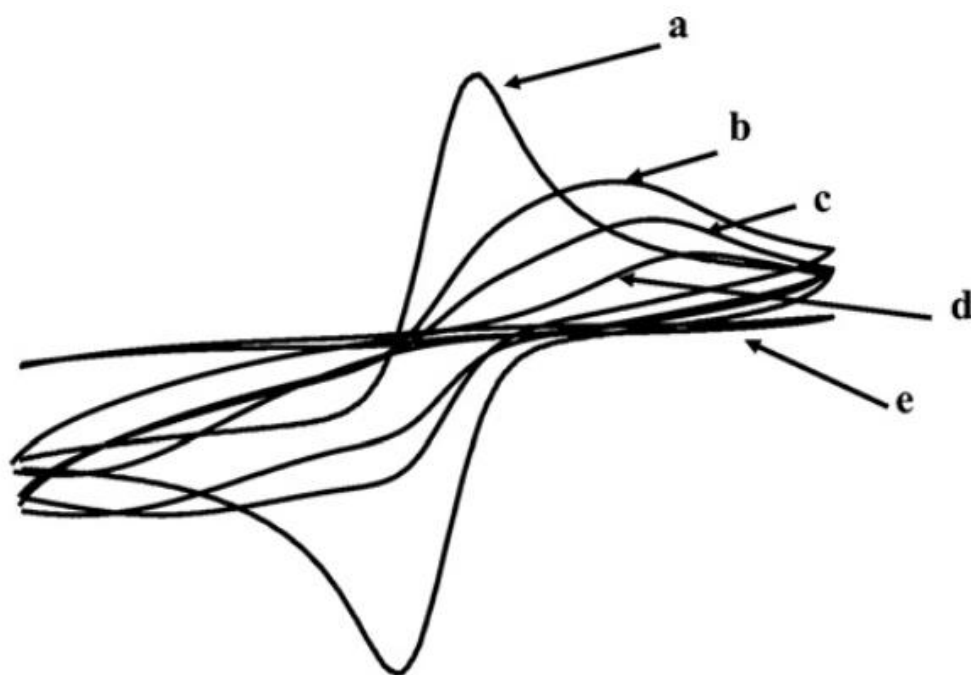
1.2.4.3. Phân loại cảm biến sinh học điện hóa

Cảm biến sinh học điện hóa có thể được phân loại theo cơ chế đo, trong đó hai loại phổ biến nhất là cảm biến đo dòng (amperometric biosensor) và cảm biến đo phổ tổng trở (impedimetric biosensor).

a. Cảm biến đo dòng

Cảm biến đo dòng hoạt động dựa trên nguyên lý đo cường độ dòng điện phát sinh từ các phản ứng oxy hóa–khử tại điện cực làm việc ở điện thế xác định. Giá trị

dòng điện thu được tỷ lệ với nồng độ chất phân tích, cho phép xác định hàm lượng chất cần đo thông qua tín hiệu điện hóa. Hệ cảm biến thường sử dụng cấu hình ba điện cực gồm điện cực làm việc, điện cực tham chiếu và điện cực đối. Dựa trên cơ chế truyền điện tử, cảm biến đo dòng được chia thành loại truyền điện tử trực tiếp và loại sử dụng các chất trung gian oxy hóa–khử. Nhờ độ nhạy, độ chọn lọc và tốc độ đáp ứng cao cùng cấu trúc đơn giản, loại cảm biến này được ứng dụng rộng rãi trong phân tích glucose, phát hiện các chỉ dấu sinh học và giám sát môi trường. [58]. Tuy nhiên, hiệu năng của cảm biến phụ thuộc đáng kể vào điện thế phân cực. Khi điện thế đặt quá cao, các phản ứng oxy hóa không mong muốn của chất tạp có thể xảy ra, làm giảm tính đặc hiệu và ảnh hưởng đến hoạt tính của thành phần nhận biết sinh học.



Hình 1.11. Đường cong volt–ampe vòng (CV) của các giai đoạn biến tính điện cực vàng trong quá trình chế tạo cảm biến sinh học phát hiện WSSV, đo trong dung dịch điện ly, tốc độ quét 0,1 V/s so với điện cực Ag/AgCl: (a) Điện cực vàng trần; (b) sau khi phủ lớp SAM thiourea; (c) sau khi hoạt hóa bằng glutaraldehyde; (d) sau khi cố định protein GST–WBP; (e) sau khi phủ 1–dodecanethiol [54].

Hình 1.11 minh họa quá trình biến tính bề mặt điện cực vàng, bước quan trọng trong việc phát triển cảm biến sinh học, nhằm phát hiện nhanh và định lượng

vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trong nước ao nuôi tôm [54]. Nguyên lý hoạt động của cảm biến dựa trên sự thay đổi điện dung khi vi-rút WSSV gắn đặc hiệu với protein GST–WBP (white spot binding protein) được cố định trên bề mặt điện cực vàng thông qua lớp SAM thiourea được hoạt hóa bằng glutaraldehyde. Trong đồ thị CV, điện cực vàng trần (a) cho tín hiệu dòng cao và đỉnh oxy hóa–khử rõ ràng. Sau khi tạo lớp SAM thiourea (b), cường độ dòng giảm mạnh do lớp cách điện ngăn cản quá trình truyền điện tích. Bước hoạt hóa bằng glutaraldehyde (c) tiếp tục làm tăng điện trở truyền điện tích, thể hiện qua việc dòng giảm thêm. Khi cố định protein GST–WBP (d), dòng điện giảm rõ rệt hơn do lớp protein cản trở khuếch tán ion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Cuối cùng, khi phủ 1–dodecanethiol (e), tín hiệu dòng gần như triệt tiêu hoàn toàn, xác nhận bề mặt điện cực đã được phủ kín hoàn toàn. Sự giảm dần của cường độ dòng theo từng bước chứng minh quá trình biến tính điện cực diễn ra thành công, tạo nền tảng cho việc cố định đầu thu sinh học đặc hiệu WSSV sử dụng cảm biến điện dung.

b. Cảm biến đo phổ tổng trở

Cảm biến phổ tổng trở điện hóa EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) hoạt động dựa trên việc đo sự thay đổi trở kháng của hệ điện hóa khi có tương tác sinh học trên bề mặt điện cực. Khi một điện áp xoay chiều hình sin biên độ nhỏ được áp vào hệ, dòng điện đáp ứng sẽ lệch pha so với điện áp một góc θ .

$$U(\omega) = U_0 e^{i\omega t} \quad (1.1)$$

$$I(\omega) = I_0 e^{i(\omega t + \theta)} \quad (1.2)$$

Tổng trở của hệ lúc này được biểu diễn như sau:

$$Z(\omega) = U(\omega)/I(\omega) = U_0/I_0 e^{-i\theta} = |Z| e^{-i\theta} \quad (1.3)$$

$Z(\omega)$ cũng có thể được biểu diễn dưới dạng hàm phức trong đó Z' là thành phần thực và Z'' là phần ảo:

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' \quad (1.4)$$

$$|Z|^2 = (Z')^2 + (Z'')^2 \quad (1.5)$$

Trong đó: $Z' = |Z| \cos \theta$, $Z'' = |Z| \sin \theta$, $\theta = \arctan(\frac{Z''}{Z'})$. Kết quả khảo sát phổ tổng trở theo tần số thu được sẽ được biểu diễn trên mặt phẳng Nyquist [$Z'(\omega)$ vs. $Z''(\omega)$] hoặc mặt phẳng Bode [$|Z(\omega)|$ vs. f] hay [$\log|Z(\omega)|$ vs. $\log(f)$].

Phép đo EIS được chia làm hai loại:

- EIS không Faradaic: trong dung dịch không chứa cặp oxi hóa–khử.
- EIS Faradaic: trong dung dịch có cặp oxi hóa–khử (thường dùng $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ hoặc $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$).

Bằng cách quét tín hiệu xoay chiều có biên độ nhỏ trên một dải tần số từ cao đến thấp tại điện thế một chiều cố định của điện cực làm việc, phổ tổng trở của cảm biến được xác định. Kết quả thu được có thể được biểu diễn dưới dạng đồ thị Nyquist hoặc Bode, và được mô phỏng bằng mô hình mạch điện tương đương Randles gồm điện trở dung dịch R_s , điện dung lớp kép C_{dl} , điện trở truyền điện tích R_{CT} và trở kháng khuếch tán Warburg Z_W , đối với hệ điện ly chứa cặp chất oxi hóa–khử [58]. Trong đó, R_{CT} đặc trưng cho quá trình truyền điện tích giữa dung dịch điện ly và điện cực làm việc, chịu ảnh hưởng bởi độ dẫn và hình thái bề mặt điện cực. Z_W phản ánh quá trình khuếch tán của ion từ dung dịch điện ly đến bề mặt điện cực, thành phần này có giá trị rất nhỏ tại vùng tần số cao và tăng mạnh tại vùng tần số thấp.

Khi có phản ứng đặc hiệu giữa đầu thu sinh học và chất cần phân tích trong cảm biến miễn dịch, lớp điện môi hình thành trên bề mặt điện cực làm cản trở quá trình truyền điện tích, dẫn đến tăng giá trị R_{CT} , đây chính là tín hiệu được sử dụng để định lượng nồng độ chất.

Dựa trên cơ chế chuyển đổi tín hiệu, cảm biến phổ tổng trở gồm hai loại: cảm biến dựa trên sự thay đổi điện dung tại bề mặt điện cực khi có sự gắn kết sinh

học; và cảm biến dựa trên sự thay đổi trở kháng điện hóa của hệ trong môi trường chứa cặp chất oxi hóa–khử.

Cảm biến phổ tổng trở có ưu điểm nổi bật là phân tích trực tiếp, độ nhạy cao, ổn định tốt, và điện thế hoạt động thấp, giúp bảo toàn hoạt tính sinh học của đầu thu. Hơn nữa, phương pháp này còn cho phép theo dõi từng giai đoạn biến tính điện cực trong quá trình chế tạo cảm biến. Cảm biến loại này được ứng dụng rộng rãi trong phát hiện DNA, kháng nguyên–kháng thể.

1.3. Các nghiên cứu trong và ngoài nước về phát hiện WSSV

1.3.1. Nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, một trong những công trình tiêu biểu về phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV là đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng (Monoclonal Antibody) để chẩn đoán nhanh bệnh virus trên tôm nuôi” do nhà khoa học Đinh Thương Vân và các cộng sự tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam thực hiện năm 2011 [59].

Nghiên cứu nhằm phục vụ công tác chẩn đoán nhanh bệnh đốm trắng do vi-rút, vốn đang gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm ở Việt Nam. Nhóm nghiên cứu đã tạo thành công các dòng tế bào lai (hybridoma) có khả năng sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu với protein vỏ VP28 của vi-rút WSSV. Dựa trên kháng thể này, nhóm đã phát triển que thử nhanh cho phép phát hiện WSSV ngoài hiện trường trong thời gian 10–20 phút, với độ nhạy 96% và độ đặc hiệu tương đương bộ kit thương mại của Thái Lan.

Kháng thể đơn dòng được tạo ra cho thấy phản ứng đặc hiệu với protein VP28 của WSSV, không phản ứng chéo với các vi-rút khác gây bệnh trên tôm sú và cho kết quả âm tính với tôm khỏe mạnh. Kết quả này chứng minh tính ứng dụng cao của công nghệ kháng thể đơn dòng trong việc sản xuất sinh phẩm chẩn đoán nhanh, góp phần nâng cao năng lực phát hiện và kiểm soát dịch bệnh WSSV trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Tuy nhiên, phương pháp chỉ cung cấp kết quả định tính,

chưa hỗ trợ định lượng nồng độ và chưa tích hợp với hệ thống đo hoặc giám sát dữ liệu theo thời gian thực.

Song song với các nghiên cứu chẩn đoán, hướng tiếp cận phòng bệnh bằng chế phẩm sinh học cũng được quan tâm. Nhà khoa học Phan Tuấn Nghĩa và các cộng sự tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã triển khai đề tài “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm probiotic dạng bào tử *Bacillus* tái tổ hợp để phòng chống virus gây bệnh đốm trắng ở tôm” [60]. Nghiên cứu tập trung vào việc phát triển probiotic bào tử *Bacillus subtilis* tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên VP28 nhằm kích thích đáp ứng miễn dịch trên tôm nuôi.

Kết quả cho thấy nhóm nghiên cứu đã sản xuất thành công chế phẩm ở quy mô pilot, bao gồm 20 kg probiotic bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện VP28 dạng CotB-VP28 với mật độ lớn hơn hoặc bằng 5×10^9 bào tử/g và 10 kg chế phẩm probiotic biểu hiện VP28, có khả năng bảo vệ khoảng 70% tôm (tôm sú và tôm thẻ chân trắng) trước sự xâm nhiễm của WSSV. Đây là một hướng tiếp cận giàu tiềm năng trong phòng bệnh chủ động cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Việc ứng dụng các chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh trong phòng và trị bệnh thủy sản được xem là xu hướng tất yếu, góp phần hạn chế nguy cơ hình thành các chủng vi sinh vật kháng thuốc, đồng thời đảm bảo an toàn cho sức khỏe vật nuôi, con người và môi trường nuôi trồng. Tuy nhiên, nghiên cứu này tập trung vào hướng phòng bệnh chủ động thông qua can thiệp sinh học, không phải giải pháp chẩn đoán hoặc định lượng WSSV, do đó chưa đáp ứng nhu cầu theo dõi và phát hiện sớm trong quá trình nuôi.

1.3.2. Nghiên cứu trên thế giới

Anusha Natarajan và cộng sự đã phát triển một cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng kháng thể anti-VP28 cố định trên điện cực cacbon thủy tinh GCE (Glassy Carbon Electrode) [20]. Điện cực được biến tính bằng graphene oxide (GO) và xanh methylene (MB) để tạo bề mặt dẫn điện và hoạt hóa sinh học, sau đó tiến hành quy trình “bánh kẹp” miễn dịch gồm:

- (i) gắn kháng thể sơ cấp (VP28 Ab1)
- (ii) chặn bề mặt bằng BSA
- (iii) bắt cặp với kháng nguyên VP28
- (iv) sử dụng kháng thể thứ cấp gắn enzyme HRP (Ab2–HRP)

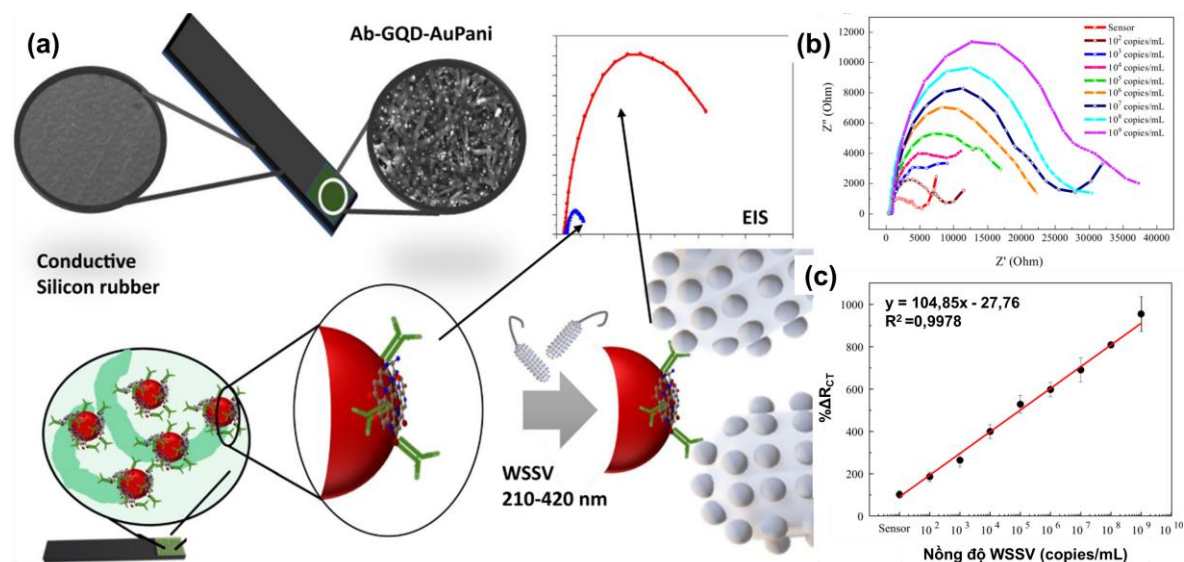
Cảm biến GCE/GO@MB này thể hiện độ chọn lọc và độ nhạy cao, cho phép phát hiện nhanh WSSV trong mẫu tôm và cua penaeid. Đường chuẩn tuyến tính được xác lập trong khoảng $1,37 \times 10^{-3} - 1,37 \times 10^7$ bản sao/ μL (copies/ μL) với hệ số tương quan $R^2 = 0,99$, và kết quả định lượng phù hợp với phân tích PCR, chứng minh tính chính xác và tiềm năng ứng dụng thực tế của nền tảng cảm biến miễn dịch điện hóa này.

Công trình cho thấy ưu điểm về độ nhạy, độ chọn lọc và khả năng đổi chiều tốt với kết quả PCR. Tuy nhiên, cảm biến sử dụng cấu trúc miễn dịch dạng “bánh kẹp” với nhiều bước chức năng hóa và gắn enzyme, làm tăng độ phức tạp trong chế tạo và vận hành. Bên cạnh đó, các phép đo vẫn được thực hiện trên hệ thống điện hóa trong phòng thí nghiệm, chưa hướng đến thiết bị đo cầm tay phục vụ chẩn đoán tại chỗ.

Vào năm 2020, vật liệu nanocompozit Ab–N,S–GQD–AuNP–PAni được phát triển trên nền cao su silicon dẫn điện (Conductive Silicon Rubber – CSR) để chế tạo cảm biến điện hóa phát hiện nhanh và nhạy vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) trong thời gian chỉ 20 phút tại Shizuoka, Nhật Bản [37]. Trong nghiên cứu này, kháng thể anti-VP28 được sử dụng làm đầu thu sinh học đặc hiệu để phát hiện protein VP28, chỉ dấu quan trọng của WSSV. Giá trị điện trở truyền điện tích (R_{CT}) của điện cực trần ban đầu thấp, nhưng tăng đáng kể khi nồng độ vi-rút mục tiêu tăng, thể hiện rõ trong phổ tổng trở điện hóa EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy). Cảm biến cho dải tuyến tính rộng từ $10^2 - 10^9$ bản sao DNA/mL (copies/mL), với giới hạn phát hiện (LOD) đạt 48,4 bản sao/mL.

Bên cạnh độ nhạy cao, cảm biến cho thấy độ chọn lọc tốt, tín hiệu ổn định trong suốt 5 tuần lưu trữ, và khả năng ứng dụng thực tế được chứng minh thông qua

phát hiện WSSV trực tiếp từ mẫu tôm bị nhiễm, với kết quả được đối chiếu bằng RT-PCR để xác nhận tính chính xác. Thiết bị cảm biến này hứa hẹn là giải pháp tiềm năng cho hệ thống giám sát WSSV tại chỗ và theo thời gian thực, đặc biệt trong các trang trại nuôi tôm thiếu cơ sở xét nghiệm hiện đại.



Hình 1.12. Cảm biến điện hóa phát hiện WSSV dựa trên phương pháp EIS với bề mặt điện cực CSR được biến tính bằng vật liệu nanocompozit Ab–GQD–AuPani. (a) Sơ đồ tổng quan và cơ chế phát hiện WSSV; (b) Biểu đồ Nyquist biểu diễn sự thay đổi trở kháng của cảm biến tại các nồng độ WSSV khác nhau trong khoảng 10^2 – 10^9 copies/mL; (c) Đường hiệu chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa phần trăm biến thiên điện trở truyền điện tích $\% \Delta R_{CT}$ và nồng độ WSSV.

Cơ chế của cảm biến được minh họa trên Hình 1.12, cảm biến được sử dụng là cảm biến điện hóa dùng một lần có độ dẫn điện cao phát hiện WSSV dựa trên phương pháp phổ tổng trở điện hóa EIS với bề mặt điện cực CSR (Conductive Silicon Rubber) được biến tính bằng vật liệu nanocompozit Ab–GQD–AuPani. Hình 1.12a minh họa cấu trúc và cơ chế phát hiện: kháng thể anti-VP28 được cố định trên lớp vật liệu dẫn điện Ab–GQD–AuPani phủ trên nền CSR, cho phép bắt giữ đặc hiệu vi-rút WSSV có kích thước 210 – 420 nm. Hình 1.12b là biểu đồ Nyquist biểu diễn sự thay đổi trở kháng của cảm biến tại các nồng độ WSSV khác nhau trong khoảng 10^2 – 10^9 bản sao DNA/mL (copies/mL). Hình 1.12c là đường hiệu chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa phần trăm biến thiên điện trở

truyền điện tích $\% \Delta R_{CT}$ và nồng độ WSSV, với phương trình hồi quy $y = 104,85x - 22,76$ và $R^2 = 0,9978$.

Nghiên cứu này đạt giới hạn phát hiện rất thấp, dải tuyến tính rộng và chứng minh được khả năng phân tích mẫu thực, thể hiện ưu thế của kỹ thuật EIS kết hợp vật liệu nanocompozit. Tuy nhiên, việc chế tạo điện cực đòi hỏi quy trình biến tính nhiều lớp với vật liệu nano phức tạp, yêu cầu điều kiện chế tạo và thiết bị đo chuyên dụng, gây khó khăn cho việc triển khai rộng rãi tại các cơ sở nuôi tôm.

1.4. Đề xuất hệ thống thiết bị chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV

1.4.1. Cơ sở và định hướng phát triển hệ thống thiết bị

Mức độ thiệt hại do bệnh đốm trắng do vi-rút WSSV gây ra là không thể bàn cãi. Vấn đề nghiêm trọng nhất là diễn biến dịch bệnh xảy ra rất nhanh, khi người nuôi nhận biết được những biểu hiện bên ngoài thì tôm thường đã nhiễm nặng và có thể chết hàng loạt chỉ sau một thời gian ngắn. Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán phổ biến như PCR, qPCR, hay ELISA có độ chính xác cao nhưng đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền, nhân lực chuyên môn và điều kiện phòng thí nghiệm được kiểm soát nghiêm ngặt. Do đó, những phương pháp này không phù hợp với việc phát hiện nhanh và chẩn đoán tại chỗ ở các vùng nuôi tôm xa trung tâm.

Mặc dù đã có nhiều công trình trong và ngoài nước nghiên cứu về cảm biến phát hiện WSSV, các hướng tiếp cận hiện tại vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế. Phần lớn các nghiên cứu quốc tế tập trung vào việc chức năng hoá điện cực nâng cao độ nhạy của cảm biến điện hóa thông qua cơ chế bắt cặp dạng “bánh kẹp” miễn dịch nhiều bước hoặc quy trình biến tính, tối ưu hóa phức tạp, đòi hỏi điều kiện thí nghiệm nghiêm ngặt và môi trường kiểm soát chính xác. Hệ thống đo sử dụng trong các nghiên cứu này chủ yếu là các thiết bị thương mại chuyên dụng đặt trong phòng thí nghiệm, có kích thước cồng kềnh, thiếu tính di động và khó ứng dụng trực tiếp tại hiện trường trong điều kiện nuôi trồng thủy sản.

Tại Việt Nam, các công trình hiện nay chủ yếu dừng lại ở mức phát hiện định tính bằng que thử nhanh (kit test) và các giải pháp phòng bệnh, chưa hướng đến định lượng nồng độ vi-rút hay thiết bị điện hóa tự động có thể hoạt động ngoài phòng thí nghiệm.

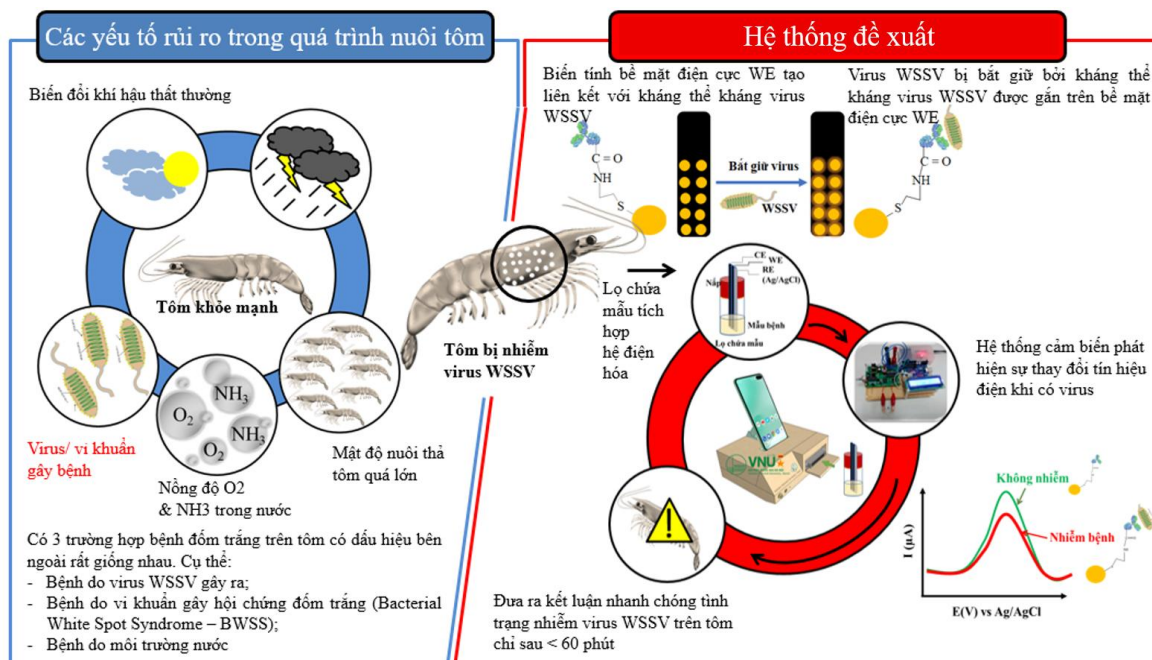
Nhìn chung, các phương pháp hiện tại vẫn bị giới hạn trong phạm vi nghiên cứu thí nghiệm, thiếu các giải pháp chẩn đoán tại chỗ (on-site diagnosis) có khả năng phát hiện nhanh, nhạy và phù hợp với điều kiện thực tế tại các trang trại nuôi tôm.

Từ thực tế đó, nghiên cứu của luận án hướng đến việc phát triển hệ thống chẩn đoán tại chỗ bệnh đốm trắng do vi-rút trên tôm nuôi nước lợ, dựa trên nền tảng cảm biến điện hóa tích hợp hệ thống đo lường. Hệ thống được thiết kế nhằm phát hiện WSSV ở nồng độ thấp, thiết lập đường chuẩn định lượng giữa nồng độ vi-rút và tín hiệu điện hóa, đồng thời rút ngắn thời gian phân tích và nâng cao độ chính xác của phép đo. Đặc biệt, thiết bị được phát triển theo hướng tăng tính di động, đơn giản hóa cấu trúc phần cứng, và tích hợp khả năng theo dõi, hiển thị dữ liệu theo thời gian thực, giúp người nuôi có thể giám sát liên tục sự biến thiên nồng độ WSSV ngay tại trại nuôi.

Cách tiếp cận này mở ra hướng nghiên cứu mới trong lĩnh vực cảm biến sinh học điện hóa, hướng tới ứng dụng thực tiễn trong giám sát và kiểm soát dịch bệnh thủy sản, đặc biệt trong điều kiện sản xuất tại chỗ - nơi chưa có phòng thí nghiệm chuyên dụng.

Hình 1.13 trình bày tổng quan các yếu tố rủi ro trong quá trình nuôi tôm và hệ thống xét nghiệm chẩn đoán WSSV đề xuất. Phần bên trái thể hiện các yếu tố môi trường và sinh học có thể dẫn đến bùng phát dịch, như biến đổi khí hậu, mật độ nuôi cao, nồng độ O_2 và NH_3 bất thường, hay sự xâm nhập của vi khuẩn, vi-rút gây bệnh. Phần bên phải mô tả nguyên lý phát hiện vi-rút WSSV bằng cảm biến điện hóa: kháng thể đặc hiệu VP28 được gắn trên bề mặt điện cực, khi bắt giữ vi-rút sẽ

tạo ra sự thay đổi đặc trưng trong tín hiệu điện hóa, cho phép xác định nhanh nồng độ nhiễm bệnh.



Hình 1.13. Minh họa Các yếu tố rủi ro trong quá trình nuôi tôm và Hệ thống chẩn đoán tại chỗ được đề xuất để phát hiện bệnh đốm trắng trên tôm nuôi.

Hệ thống thiết bị phát hiện sinh hóa tích hợp điện cực cảm biến này có khả năng định lượng nồng độ WSSV, rút ngắn thời gian xét nghiệm, đồng thời tối ưu độ nhạy và độ đặc hiệu nhờ bề mặt điện cực được chức năng hóa bằng kháng thể. Kết quả được hiển thị trực tiếp qua phần mềm điều khiển và phần mềm di động kết nối không dây, giúp người dùng dễ dàng theo dõi và lưu trữ dữ liệu.

1.4.2. Cấu trúc và nguyên lý hoạt động

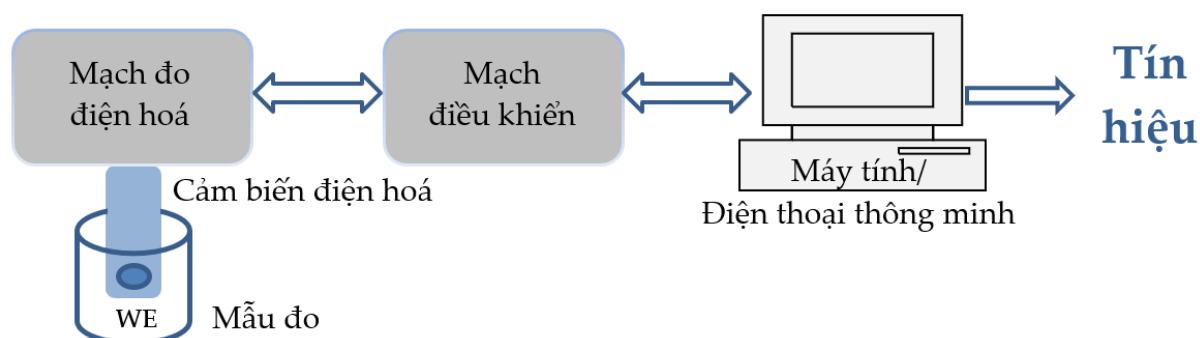
Hệ thống cảm biến sinh học điện hóa chẩn đoán WSSV được thiết kế dưới dạng thiết bị cầm tay di động, gồm ba khối chức năng chính được mô tả trong Hình 1.14.

- Thứ nhất là cảm biến điện hóa, trong đó bề mặt điện cực được chức năng hóa bằng kháng thể đặc hiệu VP28, cho phép bắt cặp chọn lọc với protein VP28 – chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút WSSV.

- Thứ hai là mạch đo điện hóa, có nhiệm vụ chuyển đổi tương tác sinh học thành tín hiệu điện đo được (dòng, điện áp). Mạch điều khiển đảm nhận việc điều khiển quá trình đo, thu nhận và truyền tín hiệu đến hệ thống xử lý.

- Thứ ba là phần mềm điều khiển và hiển thị dữ liệu, được cài đặt trên máy tính hoặc thiết bị di động, cho phép giám sát và theo dõi kết quả theo thời gian thực thông qua ứng dụng (app) chuyên dụng.

Hệ thống hoạt động dựa trên nguyên lý sự thay đổi đỉnh dòng điện, do trở kháng bề mặt thay đổi khi có tương tác vi-rút trong mẫu đo và kháng thể anti-VP28 trên bề mặt điện cực. Cường độ thay đổi tín hiệu điện hóa tương quan thuận với nồng độ WSSV trong mẫu, cho phép xác định định lượng nồng độ vi-rút. Công nghệ này có thể phát hiện WSSV ở nồng độ rất thấp, chỉ vài chục ng/mL, đáp ứng yêu cầu giám sát và phát hiện tại hiện trường.



Hình 1.14. Sơ đồ khối của hệ thống cảm biến sinh học điện hóa đề xuất.

1.4.3. Ưu điểm và tiềm năng ứng dụng

Hệ thống chẩn đoán tại chỗ được đề xuất đơn giản hóa quy trình xét nghiệm, giảm chi phí vận hành, rút ngắn thời gian phân tích, và không yêu cầu thiết bị phòng thí nghiệm chuyên dụng. Thiết bị có thể được sử dụng trực tiếp tại trại nuôi, giúp người dân tự kiểm tra mẫu bệnh, theo dõi nguồn nước, và chủ động xử lý kịp thời.

Công nghệ lõi được phát triển thành công trong nghiên cứu này, cảm biến điện hóa trên nền tảng IoT, có thể tiếp tục được triển khai áp dụng nhằm hỗ trợ chẩn đoán các bệnh vi-rút khác trên thủy hải sản hoặc đối với các bệnh nguy hiểm khác,

hướng tới xây dựng mạng lưới giám sát dịch bệnh tự động và thông minh trong nông nghiệp công nghệ cao.

Kết luận chương

Chương 1 đã trình bày tổng quan về bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV, các phương pháp chẩn đoán hiện nay, tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến cảm biến sinh học điện hóa phát hiện WSSV. Qua phân tích, có thể nhận thấy rằng các phương pháp hiện tại vẫn chủ yếu được thực hiện trong phòng thí nghiệm, tập trung vào nâng cao hiệu suất quá trình chức năng hoá điện cực và tối ưu đặc tính điện hóa. Các thí nghiệm đo vẫn yêu cầu thiết bị thương mại đắt tiền, điều kiện vận hành phức tạp, và thiếu tính cơ động. Do đó, các hệ thống này chưa đáp ứng được nhu cầu phát hiện nhanh, tại chỗ và chi phí hợp lý trong điều kiện nuôi trồng thủy sản thực tế.

Trên cơ sở đó, luận án định hướng phát triển một hệ thống cảm biến sinh học điện hóa di động, có khả năng phát hiện định lượng WSSV với độ nhạy cao, thời gian phân tích ngắn, và tích hợp chức năng xử lý và hiển thị dữ liệu theo thời gian thực. Cảm biến được xây dựng dựa trên cơ chế bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên–kháng thể, sử dụng protein VP28 – đặc trưng sinh học của WSSV và kháng thể kháng VP28 làm cặp nhận biết sinh học. Những nội dung tiếp theo sẽ trình bày cơ sở khoa học và phương pháp phát triển hệ thống cảm biến điện hóa được đề xuất.

CHƯƠNG 2. CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ NGUYÊN LÝ PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ ĐIỆN HOÁ PHÁT HIỆN WSSV

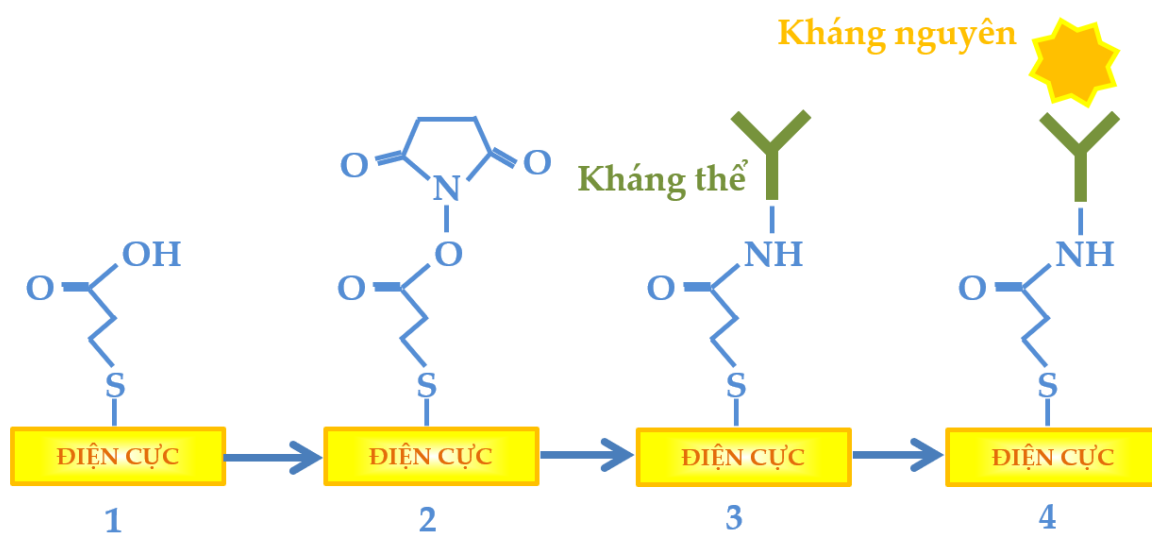
Những tiến bộ khoa học và công nghệ vật liệu đã góp phần phát triển và tối ưu cảm biến điện hóa, giúp nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu và hiệu suất tổng thể của hệ thống đo. Cảm biến sinh học điện hóa có khả năng phát hiện và định lượng các chỉ dấu sinh học trong thể tích mẫu rất nhỏ, cung cấp thông tin chẩn đoán nhanh chóng và toàn diện trong thời gian ngắn. Cùng với xu hướng vi mô hoá và tích hợp công nghệ, chương này trình bày cơ sở lý thuyết và nguyên lý phát triển hệ thống cảm biến điện hóa phát hiện WSSV được đề xuất trong chương 1. Trước hết, chương này làm rõ cơ chế chức năng hóa bề mặt điện cực, bao gồm đầu thu sinh học, đơn lớp tự lắp ráp (SAM) và vật liệu nano trong việc tăng cường khả năng nhận biết cũng như truyền tín hiệu điện hóa. Tiếp theo, các phương pháp đo điện hóa quét thế tuần hoàn CV, von-ampe sóng vuông SWV và phổ tổng trở điện hoá EIS, được trình bày nhằm xác định các đặc trưng điện hóa liên quan đến quá trình phát hiện WSSV. Sau đó, chương 2 giới thiệu cấu trúc hệ thống đo lường điện hóa tích hợp IoT, cùng các công cụ hỗ trợ xây dựng phần cứng và phần mềm điều khiển (Potentiostat, mạch điều khiển, Arduino IDE, Python, MIT App Inventor) phục vụ việc xử lý và truyền, thu tín hiệu theo thời gian thực.

2.1. Chức năng hoá điện cực

Việc phát hiện protein chủ yếu dựa vào các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch, bao gồm hóa mô miễn dịch (IHC) [61], [62], xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA) [62], [63], đo tế bào dòng chảy [64] và microarray protein [65]. Bên cạnh đó, cảm biến điện hóa ngày càng được phát triển trong lĩnh vực điện hóa để nâng cao hiệu quả phân tích [66]. Sở hữu các đặc điểm như tính linh hoạt, nhỏ gọn và giá cả phải chăng [67], cảm biến điện hoá đã được mở rộng phạm vi ứng dụng, đặc biệt là trong việc theo dõi và phát hiện các chỉ dấu sinh học [68]. Nhờ độ nhạy và độ chọn lọc cao, các cảm biến sinh học điện hóa đã nhận được sự đầu tư đáng kể vào cả nghiên cứu và sản xuất, đặc biệt cảm biến sinh học điện hóa dựa trên

cơ chế ghép cặp kháng thể-kháng nguyên đặc hiệu được phát triển rộng rãi [69]–[71].

Cảm biến sinh học điện hoá có thể phát hiện và định lượng nhiều dấu ấn sinh học trong một mẫu duy nhất, cung cấp thông tin chẩn đoán toàn diện trong khoảng thời gian ngắn. Trong cấu trúc cảm biến, điện cực đóng vai trò trung tâm, là nơi diễn ra các tương tác sinh học và quá trình chuyển đổi điện tích. Sự phát triển của công nghệ điện hoá tiên tiến đã thúc đẩy sự ra đời của cảm biến điện hoá màng in, mang lại giải pháp chẩn đoán di động, chi phí hợp lý và dễ sử dụng trong môi trường hạn chế về thiết bị [72]. Song song đó, việc tích hợp vật liệu nano đã tạo ra bước ngoặt trong thiết kế cảm biến điện hoá. Các vật liệu này giúp tăng diện tích bề mặt hoạt động, cải thiện khả năng vận chuyển điện tích và nâng cao hoạt tính xúc tác, từ đó cải thiện độ nhạy và giảm giới hạn phát hiện [73]–[76]. Hơn nữa, việc kết nối cảm biến điện hoá với các nền tảng di động, đặc biệt là điện thoại thông minh, đã mở rộng ứng dụng của cảm biến trong giám sát thời gian thực, phân tích dữ liệu từ xa và chẩn đoán tại chỗ [77].



Hình 2.1. Chức năng hóa điện cực dựa trên cơ chế kháng thể - kháng nguyên.

Từ góc độ cấu trúc, một điện cực cảm biến sinh học điện hoá được chức năng hóa hoàn chỉnh thường gồm ba lớp chính, hình thành tuần tự từ nền dẫn điện ra ngoài:

- Lớp hạt nano (AuNPs, AgNPs): tăng diện tích bề mặt hoạt động, cải thiện khả năng dẫn truyền điện tích và cung cấp nhiều vị trí neo cho các phân tử liên kết.

- Đơn lớp tự lắp ráp SAM (Self-Assembled Monolayer): tạo cầu nối hóa học bền vững giữa bề mặt điện cực và đầu thu sinh học, đồng thời kiểm soát hướng cố định đầu thu sinh học và ngăn hấp phụ không đặc hiệu.

- Đầu thu sinh học: là lớp phân tử sinh học được cố định trên bề mặt điện cực (enzyme, aptamer, DNA hoặc kháng thể) để bắt giữ đặc hiệu các phân tử mục tiêu.

Các lớp này phối hợp hài hòa, tạo nên nền tảng điện cực ổn định, nhạy và có tính chọn lọc cao, là tiền đề cho các phương pháp đo lường điện hóa được trình bày trong mục 2.2. Hình 2.1 minh họa quy trình chức năng hóa điện cực vàng dựa trên cơ chế kháng thể - kháng nguyên, trong đó đầu thu sinh học là kháng thể được cố định trên bề mặt điện cực vàng thông qua lớp SAM. Quy trình gồm các bước: (1) hình thành đơn lớp tự lắp ráp SAM, (2) kích hoạt SAM, (3) cố định kháng thể, (4) bắt giữ kháng nguyên.

Sau khi nắm được cấu trúc tổng thể của quá trình chức năng hóa điện cực, các phần tiếp theo sẽ lần lượt trình bày chi tiết từng thành phần chính gồm đầu thu sinh học, đơn lớp tự lắp ráp SAM và lớp vật liệu nano – các yếu tố quyết định đến độ nhạy, độ chọn lọc và khả năng tái lập của cảm biến sinh học điện hóa.

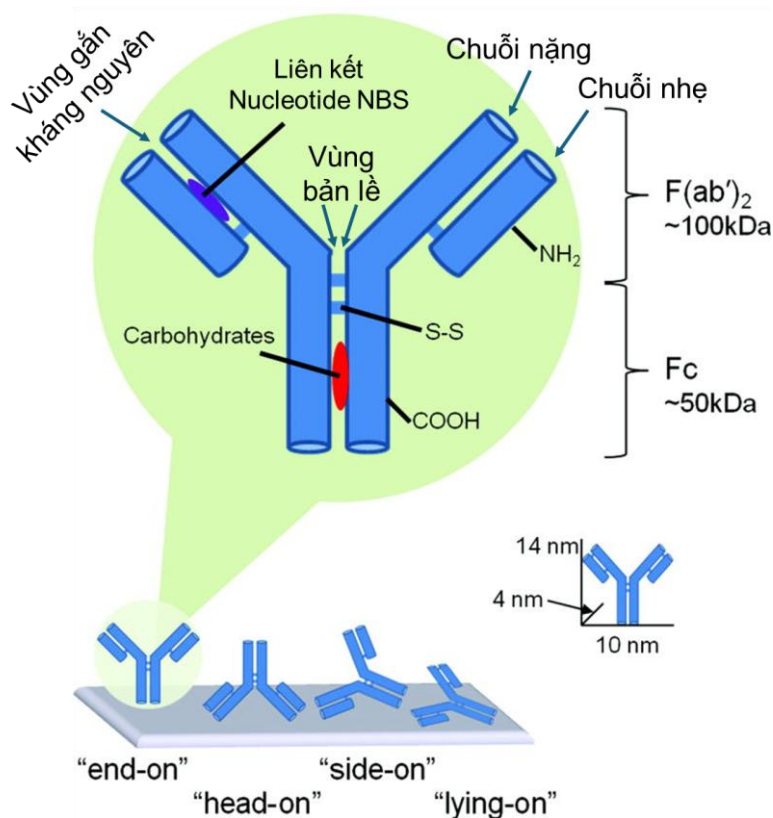
2.1.1. Đầu thu sinh học

Đầu thu sinh học là thành phần nhận biết đặc hiệu trong cảm biến sinh học, có chức năng tương tác với chất phân tích thông qua các quá trình sinh học hoặc hóa sinh. Sự tương tác này tạo ra những thay đổi về tính chất vật lý, hóa học tại bề mặt điện cực, từ đó được bộ chuyển đổi tín hiệu ghi nhận và chuyển thành tín hiệu đo được.

Tùy theo cơ chế nhận biết, đầu thu sinh học có thể là kháng thể, enzyme, axit nucleic, aptamer, tế bào và polyme in phân tử. Trong số đó, đầu thu kháng thể được

sử dụng rộng rãi với khả năng nhận biết đặc hiệu các kháng nguyên, vi sinh vật gây bệnh, độc tố và các chỉ dấu sinh học khác với độ chọn lọc cao [78].

Trong nghiên cứu này, kháng thể anti-VP28 được lựa chọn làm đầu thu sinh học để nhận biết protein VP28 – protein cấu trúc đặc trưng của vi-rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV). Hiệu quả phát hiện của cảm biến không chỉ phụ thuộc vào đặc tính nhận biết của kháng thể mà còn chịu ảnh hưởng bởi mật độ phân bố, độ ổn định và định hướng của các phân tử kháng thể trên bề mặt điện cực. Do đó, việc xây dựng lớp chức năng hóa thích hợp nhằm cố định kháng thể một cách hiệu quả là yếu tố quan trọng quyết định độ nhạy và độ tin cậy của cảm biến.



Hình 2.2. Cấu trúc, kích thước và các vị trí chức năng quan trọng của phân tử kháng thể, cùng các định hướng bám đặc trưng trên bề mặt điện cực [79].

Hình 2.2 mô tả cấu trúc, kích thước và các vị trí chức năng quan trọng của phân tử kháng thể, cùng các định hướng bám đặc trưng trên bề mặt điện cực [79]. Kháng thể (immunoglobulin – Ig) là các globulin miễn dịch có khối lượng phân tử

khoảng 150 kDa, với kích thước trung bình $14 \text{ nm} \times 10 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ [80], được cấu tạo từ bốn chuỗi polypeptide gồm hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) liên kết với nhau bằng các cầu nối disulfide (S–S), tạo thành cấu trúc hình chữ Y đặc trưng [81]. Kháng thể gồm hai vùng chức năng chính: vùng Fab (Fragment antigen-binding) và vùng Fc (Fragment crystallizable). Hai vùng Fab tạo thành mảnh $F(ab')_2$, nối với nhau bằng vùng bản lề (hinge region) chứa cầu nối disulfide (S–S). Vùng Fab chịu trách nhiệm nhận biết và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thông qua vị trí gắn nucleotide (NBS), vùng Fc mang đặc tính hóa lý khác biệt, có thể định hướng cho quá trình cố định lên bề mặt vật liệu.

Tương tác giữa kháng nguyên (Ag) và kháng thể (Ab) tuân theo nguyên tắc “ổ khóa – chìa khóa” được duy trì bởi các lực không cộng hóa trị bao gồm lực ion, liên kết hydro, lực Van der Waals và tương tác kỵ nước. Phản ứng miễn dịch này có tính thuận nghịch, được mô tả như sau:



Phức hợp Ab-Ag phụ thuộc vào nhiệt độ, độ pH, dung môi và hằng số ái lực K_a phản ánh mức độ gắn kết giữa kháng nguyên và kháng thể, đạt giá trị khoảng 10^{15} M^{-1} , được xác định theo công thức:

$$K_a = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab] \cdot [Ag]} \quad (2.2)$$

Trên bề mặt điện cực, kháng thể có thể được cố định theo nhiều định hướng khác nhau như “end-on”, “head-on”, “side-on”, hoặc “lying-on”, tùy thuộc vào phương pháp và điều kiện cố định. Định hướng này ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng nhận biết và bắt giữ kháng nguyên, từ đó quyết định độ nhạy và hiệu suất của cảm biến sinh học. Việc kiểm soát định hướng và mật độ bề mặt của kháng thể được xem là yếu tố then chốt trong thiết kế và tối ưu hóa cảm biến miễn dịch.

Theo Welch và cộng sự [79] hiệu suất của phản ứng miễn dịch đạt tối ưu khi vùng gắn kháng nguyên (Fab) của kháng thể được hướng ra ngoài dung dịch, trong

khi vùng Fc bám chắc vào bề mặt (end-on). Trái lại, việc gắn ngẫu nhiên có thể dẫn đến hiện tượng “head-on”, “side-on”, hoặc “lying-on”, làm giảm khả năng bắt giữ kháng nguyên do cản trở lập thể hoặc mất hoạt tính sinh học.

Các chiến lược cố định kháng thể hiện nay có thể chia thành ba nhóm chính:

(i) Hấp phụ vật lý – đơn giản, nhưng khó kiểm soát định hướng và dễ gây biến tính.

(ii) Liên kết cộng hóa trị – sử dụng các nhóm chức như amine, carboxyl, thiol, hoặc carbohydrate để tạo liên kết bền với lớp SAM, giúp cải thiện mật độ và độ ổn định.

(iii) Liên kết ái lực sinh học – tận dụng các tương tác đặc hiệu như Protein A/G–Fc, biotin–streptavidin, DNA–DNA hoặc peptide gắn vật liệu, cho phép kiểm soát định hướng hiệu quả hơn.

Mỗi phương pháp đều có ưu điểm và hạn chế riêng, và đến nay vẫn chưa có quy trình nào được coi là tiêu chuẩn. Do đó, việc lựa chọn phương pháp cố định phù hợp cần được cân nhắc dựa trên tính chất hóa lý của bề mặt điện cực, điều kiện phản ứng, và khả năng duy trì hoạt tính sinh học của kháng thể. Để đạt được điều này, cần nghiên cứu sâu hơn đặc điểm cấu trúc, cơ chế nhận biết và yếu tố định hướng của kháng thể, nhằm lựa chọn phương pháp cố định tối ưu cho cảm biến sinh học điện hóa.

2.1.2. Đơn lớp tự lắp ráp SAM

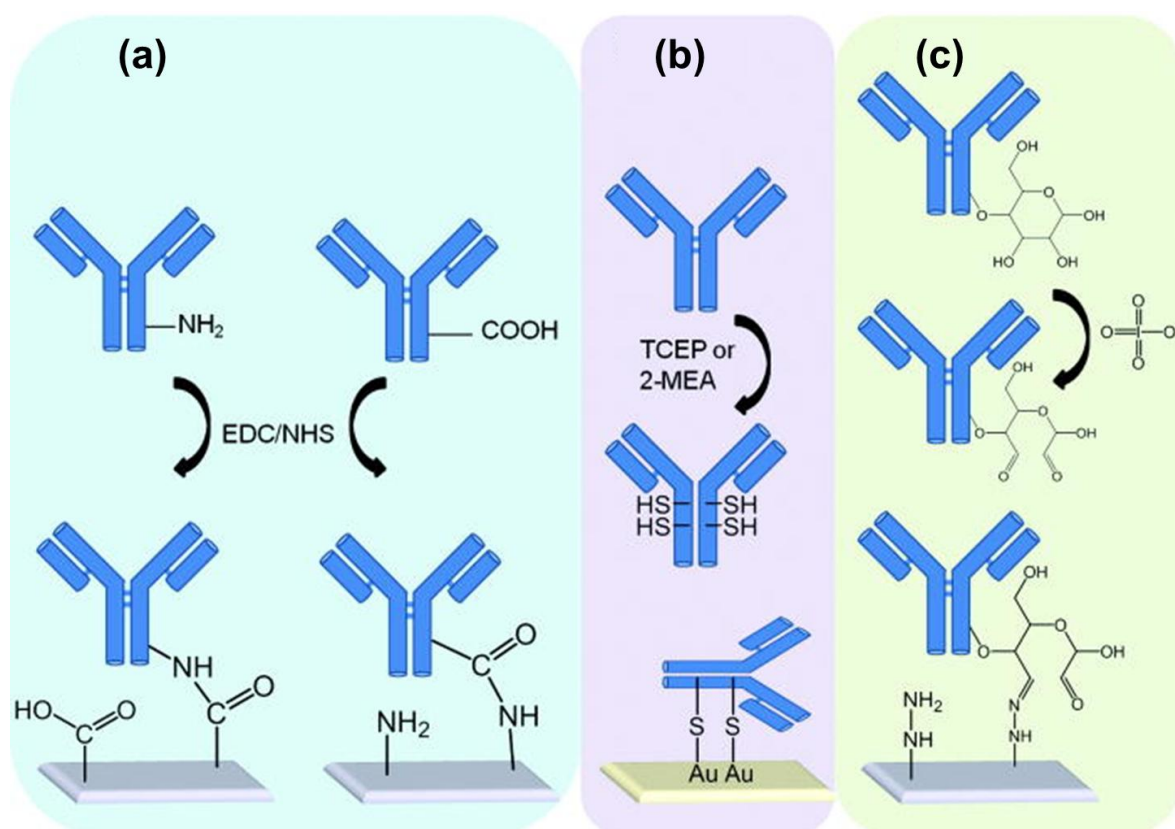
Sự hình thành đơn lớp tự lắp ráp SAM (Self-Assembled Monolayer) là một phương pháp hiệu quả để biến tính hóa học bề mặt, nhằm thúc đẩy quá trình hấp phụ hoặc tạo các nhóm chức cho liên kết cộng hóa trị với kháng thể. SAM thường được tạo thành từ các phân tử có hai đầu chức năng hoạt động, một đầu neo bám lên bề mặt vật liệu điện cực, đầu còn lại hướng ra ngoài dung dịch để cung cấp các nhóm chức cho quá trình cố định protein hoặc gắn kháng thể. Phần chuỗi

hydrocarbon ở giữa tạo nên sự ổn định của lớp SAM nhờ tương tác kỵ nước giữa các chuỗi, tạo nên lớp phủ trật tự, bền vững và có khả năng tái lập cao.

Trong cảm biến điện hóa nền vàng, tương tác vàng–thiol (Au–S) được khai thác phổ biến nhất thông qua việc sử dụng alkanethiol làm phân tử cầu nối [82], [83]. Các hợp chất này có thể gắn bền vững lên nền vàng qua nhóm thiol (–SH), đồng thời cung cấp các đầu nhóm chức như –COOH, –NH₂ hoặc –CH₃ hướng ra ngoài để gắn kháng thể bằng liên kết hấp phụ hoặc cộng hóa trị. Lớp quan trọng này đóng vai trò là lớp trung gian giữa bề mặt của điện cực vàng và đầu thu sinh học [84]–[86].

Các lớp SAM đóng vai trò trung gian quan trọng trong việc cố định các yếu tố nhận dạng sinh học như kháng thể, kháng nguyên, DNA, enzyme hoặc aptamer [87]–[89]. Nhờ cấu trúc định hướng tốt và độ bền hóa học cao, SAM giúp kiểm soát tính chất bề mặt, giảm liên kết không đặc hiệu, tăng cường độ nhạy và duy trì hoạt tính sinh học của lớp nhận dạng. Những đặc tính này khiến SAM trở thành thành phần không thể thiếu trong việc phát triển các cảm biến sinh học có độ chọn lọc và độ nhạy cao, phục vụ nhiều lĩnh vực từ chẩn đoán y sinh đến giám sát môi trường [90].

Hình 2.3 mô tả các phương pháp cố định định hướng kháng thể lên bề mặt vật liệu bao gồm: Tạo liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm amine (–NH₂) và carboxyl (–COOH) thông qua phản ứng hoạt hóa EDC/NHS, hình thành liên kết amide bền vững giữa kháng thể và bề mặt chức năng hóa (Hình 2.3a); Khử cầu nối disulfide (S–S) của kháng thể bằng TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) hoặc 2-MEA (2-mercaptoethylamine) để tạo nhóm thiol (–SH) tự do, sau đó liên kết với nền vàng thông qua liên kết Au–S, giúp cố định kháng thể định hướng và ổn định (Hình 2.3b); Oxy hóa các nhóm hydroxyl trong chuỗi carbohydrate ở vùng Fc của kháng thể bằng sodium periodate, tạo ra các vị trí phản ứng hoạt hóa có thể liên kết với bề mặt mang nhóm hydrazide (–NH–NH₂), hình thành cầu nối hydrazone bền vững giữa kháng thể và vật liệu nền (Hình 2.3c) [79].



Hình 2.3. Các phương pháp cố định định hướng kháng thể lên bề mặt vật liệu. (a) Liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm amine (-NH_2) và carboxyl (-COOH) thông qua phản ứng hoạt hóa EDC/NHS; (b) Khử cầu nối disulfide (S-S) của kháng thể bằng TCEP hoặc 2-MEA để tạo nhóm thiol tự do (-SH), sau đó liên kết với nền vàng thông qua liên kết Au-S ; (c) Oxy hóa nhóm carbohydrate trong vùng Fc của kháng thể phản ứng với bề mặt mang nhóm hydrazide, hình thành liên kết hydrazone định hướng cao giữa kháng thể và vật liệu nền [79].

Axit (R)-2-Amino-3-mercaptopropionic, còn được gọi là L-Cysteine, là một axit amin tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các đơn lớp tự lắp ráp (SAM) trong các ứng dụng hóa học bề mặt của hệ thống sinh học. Tính tương thích sinh học cao khiến hợp chất này phù hợp cho các ứng dụng y sinh và công nghệ sinh học [91]. L-Cysteine chứa nhóm thiol (-SH), yếu tố thiết yếu cho sự hình thành SAM nhờ khả năng tạo liên kết vàng-thiol (Au-S) mạnh mẽ và bền vững với nhiều bề mặt kim loại [92], đặc biệt là vật liệu nền vàng [93], [94]. Do đó, L-Cysteine có thể được sử dụng để chức năng hóa bề mặt điện cực phục vụ các quá trình liên hợp sinh học.

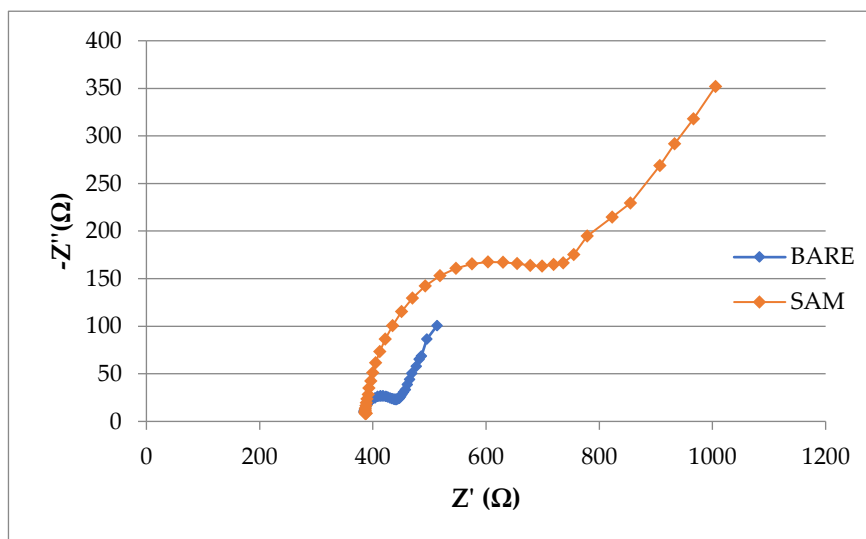
Trong nghiên cứu của Yan và cộng sự [95], SAM L-Cysteine đã được sử dụng để sửa đổi cảm biến điện hóa vàng, cho phép phát hiện các ion đồng trong các mẫu môi trường với giới hạn phát hiện thấp dưới 5 ppb. Tương tự, Moccelini và cộng sự [91] đã sử dụng cảm biến sinh học được cải tiến bằng SAM L-Cysteine trên điện cực vàng để phát hiện dopamine, đạt giới hạn phát hiện $4,78 \times 10^{-7}$ mol/L trong dải nồng độ từ $9,91 \times 10^{-6}$ đến $2,21 \times 10^{-4}$ mol/L thông qua phương pháp von-ampe sóng vuông. Sự hiện diện của lớp L-Cysteine tự lắp ráp trên điện cực vàng đã cung cấp nền tảng ổn định cho quá trình cố định đầu thu sinh học và tăng cường tín hiệu phát hiện.

Ngoài ra, Aydin và cộng sự [96], đã sử dụng SAM từ 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) để biến tính các hạt nano vàng, tạo giao diện ổn định và tương thích sinh học cho quá trình cố định kháng thể thông qua phản ứng hoạt hóa nhóm –COOH bằng EDC/NHS, hình thành liên kết amide bền vững với các nhóm –NH₂ trên kháng thể. Cảm biến sinh học thu được đạt được giới hạn phát hiện (LOD) cực thấp là 0,577 fg/mL đối với protein miễn gắn thụ thể của SARS-CoV-2, đồng thời thể hiện tính lặp lại và độ ổn định cao.

Trong cả hai trường hợp, các SAM đều cung cấp các nhóm chức cần thiết cho sự gắn kết của phân tử sinh học và góp phần tăng cường tín hiệu. Những nghiên cứu này nhấn mạnh tiềm năng của MUA và L-Cysteine như những chất biến tính bề mặt đa năng, đồng thời chỉ ra sự cần thiết phải tiếp tục nghiên cứu ứng dụng thực tiễn của chúng trong các nền tảng cảm biến miễn dịch đơn giản hóa. Trong nghiên cứu này, luận án đề xuất một chiến lược phát hiện protein đơn giản, nhấn mạnh vai trò then chốt của các lớp SAM trong phát triển cảm biến miễn dịch điện hóa phát hiện WSSV.

Hình 2.4 minh họa đáp ứng phổ trở kháng điện hóa của điện cực vàng được phủ đơn lớp tự lắp ráp SAM so với điện cực vàng trần (bare), đáp ứng phổ cho thấy đường kính của vòng bán nguyệt tăng rõ rệt sau khi điện cực được gắn đơn lớp SAM. Những biến thiên rõ rệt trong tín hiệu điện thu được này chính là cơ sở để

nhận biết sự thay đổi bề mặt của điện cực, làm cơ sở dấu hiệu nhận biết sự hình thành các lớp hoá chất trên bề mặt điện cực sau các bước biến tính và dấu hiệu nhận biết nồng độ vi-rút trong các nghiên cứu tiếp theo của đề tài.



Hình 2.4. Đáp ứng phổ trở kháng của điện cực trần (Bare) và điện cực được gắn SAM.

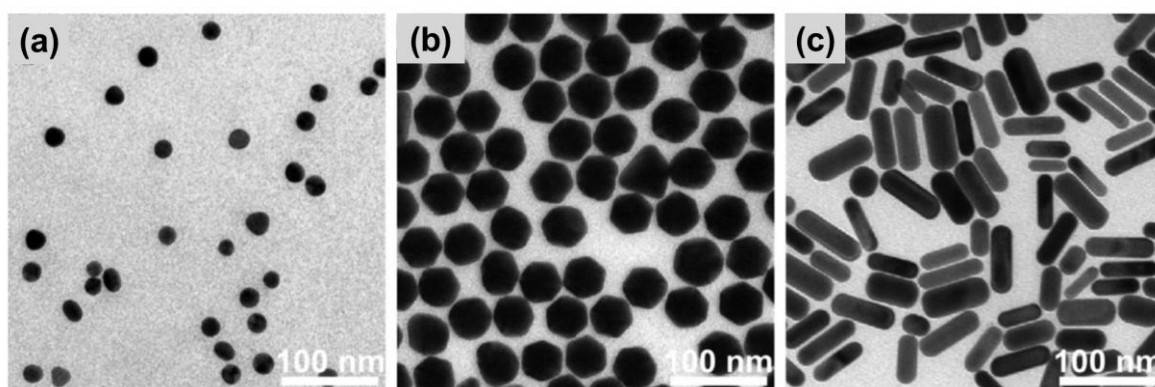
2.1.3. Các hạt vàng nano AuNPs

Quá trình tổng hợp các hạt nano vàng AuNPs (Gold nanoparticles) nhằm tăng diện tích bề mặt hoạt động của điện cực, cải thiện khả năng truyền điện tích và tạo nền tảng thích hợp để gắn kết lớp tự lắp ráp SAM. Nhờ tính dẫn điện cao, tính trơ hóa học và khả năng tương thích sinh học, lớp AuNPs không chỉ làm tăng độ nhạy cảm biến mà còn đảm bảo sự ổn định cơ học, điện hóa của bề mặt khi có định kháng thể hoặc các đầu thu sinh học khác.

Các hạt nano vàng được hình thành trực tiếp trên bề mặt điện cực bằng kỹ thuật quét thế tuần hoàn CV lặp lại trong dung dịch muối vàng HAuCl_4 , sau đó làm sạch trong dung dịch axit mạnh H_2SO_4 1 M [97]. Quá trình hình thành hạt vàng trong dung dịch muối vàng được mô tả theo phương trình (2.3):



Bằng phương pháp điện hóa, các hạt nano vàng được hình thành và phân bố đồng đều trên bề mặt điện cực. Việc lặp lại chu kỳ quét tạo điều kiện cho quá trình tạo mầm và phát triển thành các hạt nano đồng đều. Các đặc trưng hình thái của lớp nano vàng bao gồm kích thước và mật độ phân bố hạt vàng, có thể được điều chỉnh thông qua nồng độ dung dịch HAuCl_4 , thành phần dung dịch đệm, khoảng điện thế quét hoặc số vòng quét.



Hình 2.5. Ảnh hiển vi điện tử TEM của các cấu trúc hạt vàng: (a) Hạt nano vàng hình cầu ($d = 20$ nm); (b) Hạt nano vàng hình cầu ($d = 45$ nm); (c) Hạt nano vàng dạng thanh [98].

Hình 2.5 trình bày ảnh hiển vi điện tử TEM của các hạt nano vàng được tổng hợp với kích thước và hình dạng khác nhau: Hạt nano vàng hình cầu đường kính 20 nm (Hình 2.5a), hạt nano vàng hình cầu đường kính 45 nm (Hình 2.5b), hạt nano vàng dạng thanh (Hình 2.5c). Các hạt nano vàng hình cầu có kích thước nhỏ, phân bố đồng đều, cho hoạt tính bề mặt cao, thích hợp cho các ứng dụng cần độ nhạy cao. Các hạt nano vàng hình cầu có kích thước lớn hơn ổn định hơn về mặt điện hóa. Các hạt nano vàng dạng thanh cho phép điều khiển hoạt tính điện hóa và quang học theo mặt tinh thể trội [98].

Những kết quả này minh họa rõ ảnh hưởng của hình dạng và kích thước AuNPs đến đặc tính điện hóa và hoạt tính xúc tác, qua đó khẳng định tầm quan trọng của việc tối ưu thông số trong quá trình tạo hạt vàng trên bề mặt điện cực.

2.2. Bộ phận chuyển đổi tín hiệu

Trong cảm biến sinh học, bộ phận chuyển đổi tín hiệu có nhiệm vụ chuyển đổi các phản ứng sinh hóa xảy ra tại bề mặt đầu thu thành tín hiệu có thể ghi nhận và xử lý. Tùy thuộc vào bản chất của tín hiệu đầu ra, bộ chuyển đổi có thể là điện hóa, quang học, áp điện và nhiệt học.

Trong đó, cảm biến điện hóa hoạt động dựa trên những thay đổi về tính chất điện hóa phát sinh từ tương tác giữa đầu thu sinh học và chất cần phân tích. Tùy theo đại lượng được đo, cảm biến điện hóa gồm cảm biến đo điện thế, cảm biến đo dòng, cảm biến đo độ dẫn và cảm biến đo phổ tổng trở.

Sự phát triển của công nghệ vi cơ điện tử và truyền thông không dây đã thúc đẩy việc tích hợp cảm biến điện hóa vào các thiết bị phân tích cầm tay có kích thước nhỏ gọn. Xu hướng này mở ra khả năng thực hiện các phép đo nhanh tại hiện trường và xây dựng các hệ thống xét nghiệm tại chỗ POCT (Point-of-Care Testing), góp phần mở rộng phạm vi ứng dụng của cảm biến điện hóa trong chẩn đoán y sinh, giám sát môi trường và an toàn thực phẩm [99].

Trong phạm vi nghiên cứu này, cảm biến điện hóa được lựa chọn nhờ ưu điểm vượt trội về độ nhạy, kích thước nhỏ gọn và khả năng tích hợp di động. Các phương pháp điện hóa được sử dụng bao gồm quét thế tuần hoàn (CV), von-ampe sóng vuông (SWV) và phổ tổng trở điện hóa (EIS) được trình bày chi tiết trong các mục tiếp theo.

2.3. Phương pháp điện hóa

Các phương pháp điện hóa là kỹ thuật phân tích dựa trên việc khảo sát mối quan hệ giữa dòng điện, điện thế và trở kháng tại bề mặt phân cách điện cực – dung dịch điện ly. Nhờ khả năng chuyển đổi trực tiếp các quá trình hóa – sinh xảy ra trên bề mặt điện cực thành tín hiệu điện, các phương pháp điện hóa đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong phân tích hóa học, sinh học, đặc biệt là trong lĩnh vực cảm biến sinh học và thiết bị chẩn đoán tại chỗ.

So với các phương pháp phân tích truyền thống, kỹ thuật điện hóa có nhiều ưu điểm nổi bật như độ nhạy cao, thời gian đáp ứng nhanh, thiết bị gọn nhẹ, khả năng tích hợp và tự động hóa, cũng như chi phí vận hành hợp lý. Đặc biệt, các phương pháp điện hóa rất phù hợp để phát triển hệ đo định lượng, vận hành ngoài phòng thí nghiệm, đáp ứng yêu cầu giám sát nhanh và liên tục trong các ứng dụng thực tiễn như nuôi trồng thủy sản.

Trong nghiên cứu cảm biến sinh học, tín hiệu điện hóa phản ánh sự thay đổi đặc tính bề mặt điện cực do các quá trình biến tính, cố định đầu thu sinh học hoặc tương tác đặc hiệu giữa kháng nguyên – kháng thể. Do đó, việc lựa chọn phương pháp điện hóa phù hợp đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá hiệu quả chức năng hóa bề mặt cũng như khả năng phát hiện và định lượng mục tiêu sinh học.

Trong phạm vi luận án này, ba phương pháp điện hóa chính được sử dụng và phân tích bao gồm: quét thế tuần hoàn (CV), vôn-ampe sóng vuông (SWV) và phổ tổng trở điện hóa (EIS). Mỗi phương pháp cung cấp những thông tin đặc trưng khác nhau, bổ trợ lẫn nhau trong việc khảo sát bề mặt điện cực, đánh giá động học truyền điện tích và thực hiện phép đo định lượng.

2.3.1. Quét thế tuần hoàn CV (Cyclic Voltammetry)

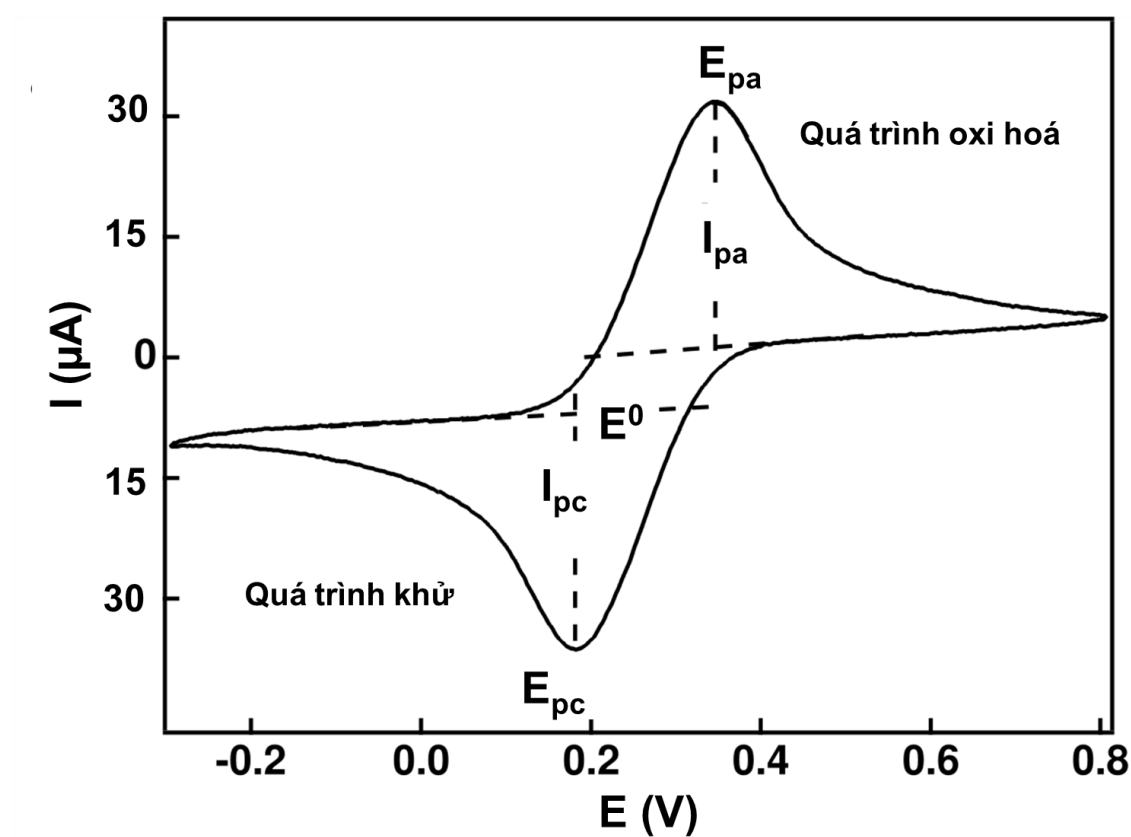
Kỹ thuật quét thế tuần hoàn CV áp một điện thế biến đổi tuần hoàn lên điện cực làm việc, sau đó đo dòng điện sinh ra như một hàm phụ thuộc của điện thế. Sự thay đổi dòng điện tuân theo định luật Nernst, phản ánh mối quan hệ giữa điện thế, nồng độ và cân bằng oxi hóa–khử tại bề mặt điện cực.

Phương trình Nernst (2.4):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} \quad (2.4)$$

Trong đó: E là điện thế điện cực thực tế (V), E^0 : điện thế chuẩn của cặp oxi hóa–khử; R là hằng số khí lý tưởng ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T là nhiệt độ tuyệt đối tính theo thang độ K, F là hằng số Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$); $[O]$, $[R]$: nồng độ hoặc

hoạt độ của chất oxi hóa và khử, n là số electron trao đổi trong một phản ứng oxi hóa–khử.



Hình 2.6. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa dòng và thế khi quét CV.

Hình 2.6 là đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa dòng và thế khi quét CV. Ở giai đoạn đầu, điện thế được quét theo chiều dương từ giá trị âm hơn so với thế chuẩn E^0 tương ứng với phản ứng oxi hoá:



Khi thế nhỏ hơn E^0 thì dòng ban đầu là dòng không-Faraday tương ứng với dòng nạp tụ. Khi điện thế đạt tới E^0 , phản ứng oxi hóa bắt đầu xảy ra và dòng điện chuyển sang dòng Faraday. Khi điện thế tiếp tục tăng về phía dương, nồng độ chất khử (R) tại bề mặt điện cực giảm do phản ứng oxi hóa, làm tăng dòng anốt. Khi nồng độ chất khử giảm đến 0 ở sát bề mặt điện cực thì dòng điện đạt cực đại anốt I_{pa}

tại điện thế cực đại anốt E_{pa} . Sau điểm này, dòng điện giảm dần do lượng chất khử giảm, trong khi đó sản phẩm oxi hóa (O) bắt đầu hình thành.

Khi quét thế ngược lại về phía âm, xảy ra phản ứng khử ngược lại:



Chất oxi hóa (O) bị khử trở lại thành chất khử (R) khi điện thế đi qua điểm E^0 . Khi điện thế tiếp tục giảm, nồng độ chất oxi hóa trên bề mặt điện cực giảm, dẫn đến dòng catốt tăng. Khi nồng độ chất oxi hóa giảm đến 0 ở sát bề mặt điện cực thì dòng điện đạt cực đại catốt I_{pc} tại điện thế cực đại catốt E_{pc} . Sau điểm này, dòng điện giảm dần do lượng chất oxi hoá giảm.

Đường cong thu được trong phép đo CV được gọi là đường phân cực vòng (Cyclic Voltammogram) biểu diễn mối quan hệ giữa dòng điện I (μA) và điện thế E (V) (Hình 2.6).

Trong hệ oxi hóa–khử thuận nghịch, độ lớn dòng I_{pc} và I_{pa} xấp xỉ bằng nhau. Sự thay đổi tốc độ quét thế ảnh hưởng đáng kể đến động học truyền điện tích và quá trình khuếch tán, làm thay đổi vị trí cũng như độ cao của các đỉnh dòng. Bên cạnh tốc độ quét, nồng độ các chất điện hoạt trong dung dịch và nhiệt độ thí nghiệm cũng là những yếu tố quan trọng quyết định đặc trưng của đường cong quét thế tuần hoàn.

Kỹ thuật quét thế tuần hoàn là công cụ quan trọng trong nghiên cứu điện hóa, được sử dụng rộng rãi để tổng hợp và biến tính vật liệu bề mặt điện cực, cố định đầu thu sinh học trong cảm biến sinh học, và khảo sát cơ chế phản ứng oxi hóa–khử, đánh giá tính thuận nghịch và độ ổn định của hệ điện cực. Kỹ thuật CV cho phép điều khiển phản ứng điện hóa thông qua các tham số điện áp và tốc độ quét theo phương trình Randles-Sevcik, từ đó hỗ trợ tối ưu hóa quá trình chế tạo và đặc trưng cảm biến sinh học.

Phương trình Randles-Sevcik:

$$i_p = (2,687 \times 10^5) n^{(3/2)} A C \sqrt{D \cdot v} \quad (2.7)$$

Trong đó: i_p là dòng điện đỉnh (A); n là số electron trao đổi trong một phản ứng oxi hóa–khử (thường = 1); A là diện tích bề mặt điện cực làm việc (cm^2); C là nồng độ mol chất oxi hóa–khử (mol/cm^3); D là hệ số khuếch tán của chất phân tích (cm^2/s); v là tốc độ quét (V/s); hằng số không đổi: $2,687 \times 10^5$ ($C mol^{-1} V^{\frac{-1}{2}}$).

2.3.2. Vôn-ampe sóng vuông SWV (Square Wave Voltammetry)

Phương pháp vôn-ampe sóng vuông SWV (Square Wave Voltammetry) là một kỹ thuật điện hóa xung có độ nhạy cao, được sử dụng rộng rãi trong phân tích định lượng các chất điện hoạt ở nồng độ thấp. Kỹ thuật này được phát triển dựa trên nguyên tắc của vôn-ampe xung vi sai (DPV) nhưng được cải tiến về tốc độ đo và tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu.

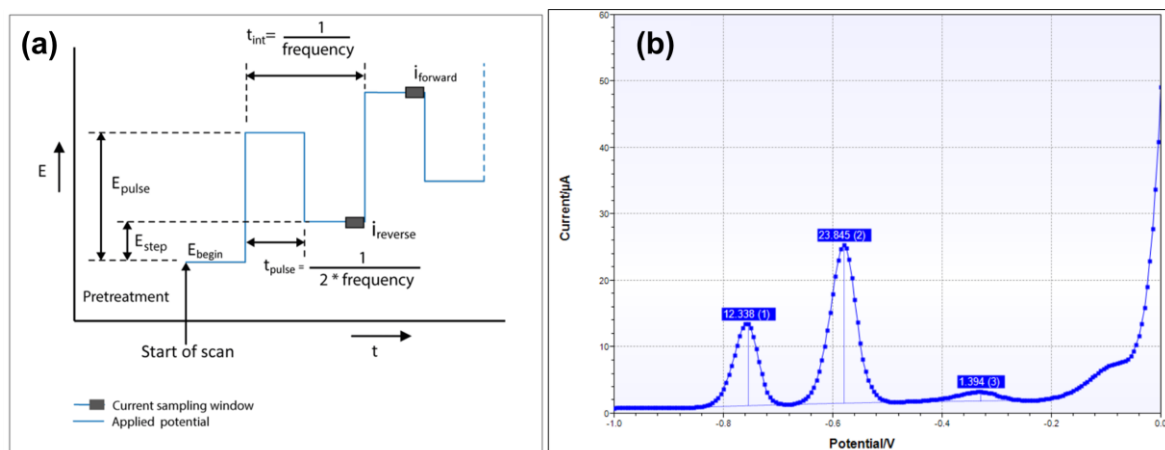
Trong SWV, điện thế đặt lên điện cực làm việc là sự chồng chập của sóng vuông (có biên độ không đổi) lên trên điện thế quét tuyến tính. Mỗi xung sóng vuông gồm hai nửa chu kỳ có điện thế đối xứng nhau quanh giá trị điện thế quét hiện tại. Dòng điện được đo ở cuối mỗi nửa chu kỳ, khi dòng điện dung đã suy giảm, do đó, hiệu dòng điện giữa hai nửa chu kỳ (anôt và catôt) phản ánh chính xác dòng Faraday liên quan đến quá trình oxi hóa–khử của chất phân tích.

Hình 2.7 là sơ đồ mô tả dạng điện thế áp dụng trong phương pháp SWV (Hình 2.7a) và đồ thị đặc trưng của phương pháp này cho tín hiệu sắc nét, độ phân giải cao (Hình 2.7b)

Phương pháp này có ưu điểm nổi bật là độ nhạy cao, thời gian đo ngắn và khả năng loại bỏ ảnh hưởng của dòng điện nền, nhờ đó đặc biệt thích hợp cho các phép đo định lượng ở nồng độ vi lượng hoặc trong cảm biến sinh học. Tín hiệu đỉnh trong phổ SWV xuất hiện tại điện thế đặc trưng cho phản ứng oxi hóa hoặc khử của chất phân tích. Cường độ dòng đỉnh (I_p) tỉ lệ thuận với nồng độ của chất đó.

So với CV hoặc DPV, SWV cho tín hiệu sắc nét, độ phân giải cao và giới hạn phát hiện thấp hơn, đồng thời giảm ảnh hưởng của điện dung lớp kép. Do đó, trong

nghiên cứu cảm biến sinh học điện hóa, SWV thường được sử dụng để đánh giá quá trình nhận biết sinh học và định lượng nồng độ kháng nguyên hoặc protein đích sau khi hoàn tất quá trình cố định đầu thu sinh học.



Hình 2.7. Phương pháp SWV: (a) Áp điện thế; (b) Đồ thị đặc trưng [PalmSens].

2.3.3. Phổ tổng trở điện hóa EIS

Phương pháp phổ tổng trở điện hóa EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) dựa trên việc áp đặt một điện áp xoay chiều biên độ nhỏ (5–10 mV) lên hệ điện hóa trong dải tần số rộng, rồi phân tích đáp ứng dòng điện. Từ đó thu được tổng trở phức $Z(\omega)$ mô tả các hiện tượng điện, hóa và khuếch tán tại bề mặt điện cực [100]. EIS có ưu điểm vượt trội là tín hiệu kích thích nhỏ nên không phá hủy cấu trúc bề mặt điện cực và không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của các phân tử được cố định trên cảm biến sinh học.

2.3.3.1. Mô hình mạch điện tương đương Randles

Phổ tổng trở điện hóa Faradaic (EIS Faradaic) được sử dụng trong điều kiện dung dịch có cặp oxi hóa–khử. Trong phép đo này, một điện áp xoay chiều dạng sin với biên độ rất nhỏ được chồng lên điện áp một chiều (DC), sao cho giá trị điện áp này trùng với thế chuẩn E^0 của phản ứng oxi hóa–khử:



trong đó: n là số điện tử, O là chất oxi hóa, R là chất khử

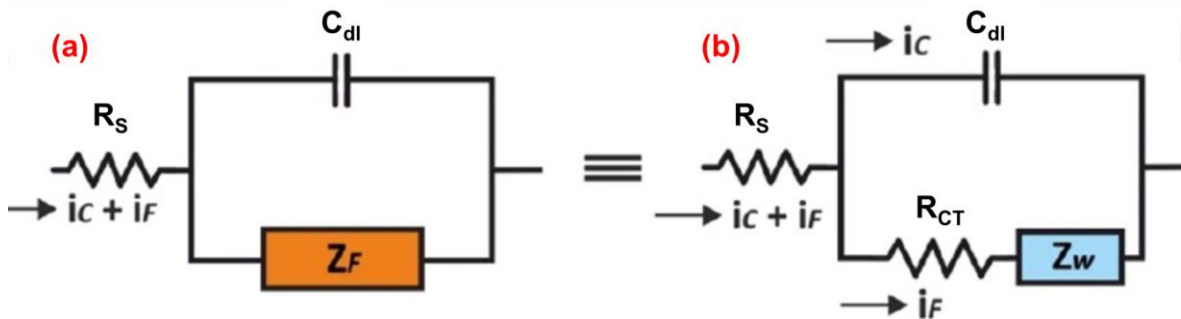
Khi đó, dòng điện tổng đi qua điện trở dung dịch R_s gồm hai thành phần chính:

- Dòng không Faraday (i_C), liên quan đến sự tích và phóng điện của lớp điện kép tại bề mặt điện cực.
- Dòng Faraday (i_F), phát sinh từ phản ứng oxi hóa–khử giữa các chất trong dung dịch.

Trong mạch điện tương đương, quá trình Faraday được mô tả bằng một trở kháng tổng quát Z_F , thể hiện đồng thời hai yếu tố:

- Tốc độ phản ứng oxi hóa–khử (động học truyền điện tích).
- Sự khuếch tán của các chất phản ứng đến bề mặt điện cực làm việc.

Do đó, trở kháng Faraday Z_F thường được phân chia thành hai phần: phần động học, phản ánh khả năng trao đổi điện tích, và phần khuếch tán, biểu diễn quá trình di chuyển của các ion trong dung dịch.



Hình 2.8. Mô hình mạch điện tương đương Randles: C_{dl} điện dung lớp kép, R_{CT} điện trở truyền điện tích, R_s điện trở dung dịch, Z_W trở kháng Warburg [100].

Hình 2.8 minh họa mô hình mạch điện tương đương Randles gồm các thành phần C_{dl} điện dung lớp kép, R_{CT} điện trở truyền điện tích, R_s điện trở dung dịch, Z_W trở kháng Warburg. Trở kháng không Faraday được mô tả bởi điện dung lớp kép C_{dl} . Trở kháng Faraday Z_F (Hình 2.8a) được mô tả bởi mạch tương đương gồm điện trở truyền điện tích R_{CT} mắc nối tiếp với trở kháng Warburg Z_W (Hình 2.8b).

Bảng 2.1 cung cấp ý nghĩa vật lý của các thành phần trong mạch điện tương đương Randles.

Bảng 2.1. Các thành phần trong mạch điện tương đương Randles.

Thành phần	Ký hiệu	Ý nghĩa vật lý
Điện trở dung dịch	R_s	- Biểu thị điện trở của dung dịch điện ly với bề mặt điện cực. - Phụ thuộc vào nồng độ ion, loại ion, nhiệt độ và hình thái bề mặt.
Điện dung lớp kép	C_{dl}	Mô tả sự tích tụ điện tích giữa điện cực và dung dịch, thể hiện quá trình phân cực không Faraday.
Điện trở truyền điện tích	R_{CT}	Biểu thị tốc độ của quá trình trao đổi electron Faraday, phụ thuộc vào hình thái bề mặt và độ dẫn của điện cực.
Trở kháng Warburg	Z_w	- Đặc trưng cho quá trình khuếch tán khối của các ion đến/đi từ bề mặt điện cực. - Ở vùng tần số thấp, trở kháng Warburg có giá trị lớn, được biểu diễn bởi đường đặc trưng nghiêng 45° .

2.3.3.2. Biểu diễn phổ tổng trở trong mặt phẳng phức

Phương trình biểu diễn phổ tổng trở trong mặt phẳng phức gồm phần thực Z' và phần ảo Z'' , như sau [100]:

$$Z'(\omega) = R_s + \frac{R_{CT} + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_{dl} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{CT} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \quad (2.9)$$

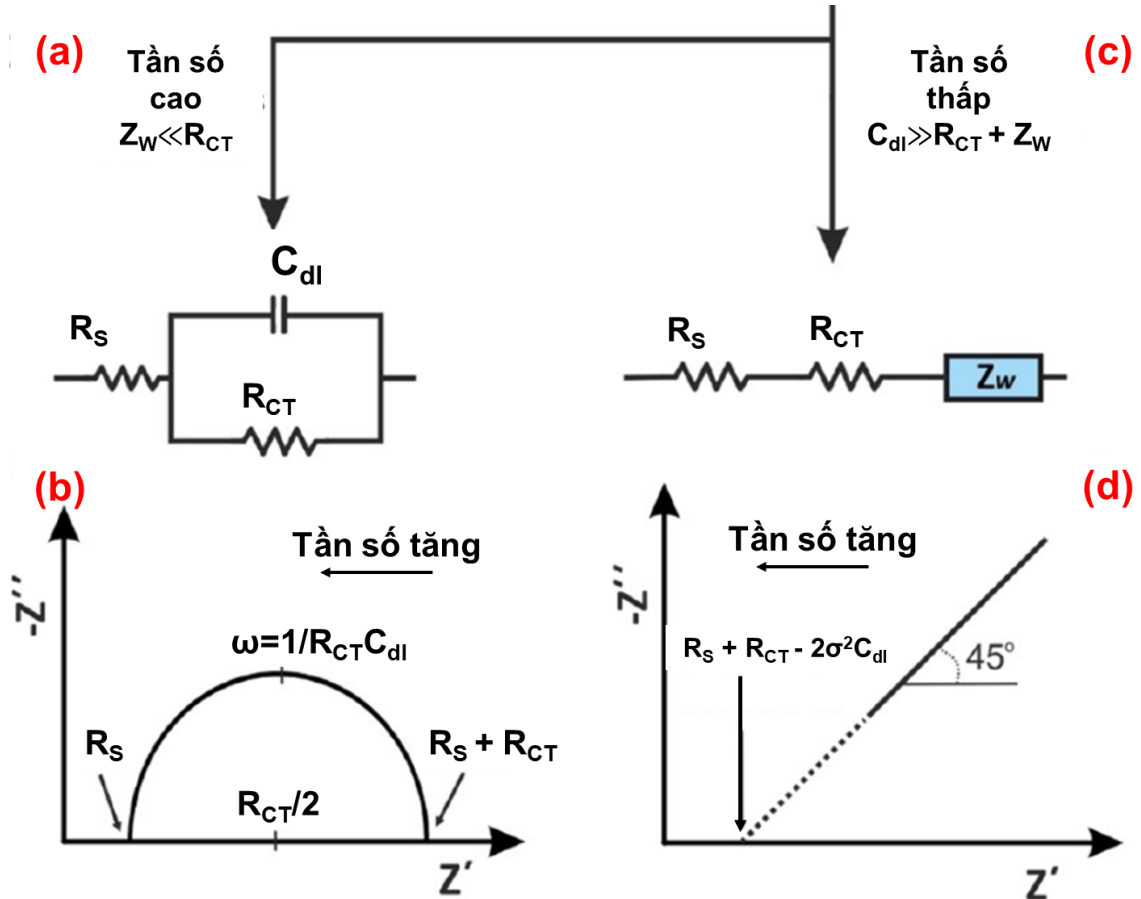
$$-Z''(\omega) = \frac{\omega C_{dl} (R_{CT} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma^2 C_{dl} + \sigma\omega^{-1/2}}{(\sigma\omega^{1/2}C_{dl} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{CT} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \quad (2.10)$$

Với hệ số:

$$\sigma = \frac{2RT}{\sqrt{2}n^2F^2\sqrt{DC}} \quad (2.11)$$

Trong đó: R là hằng số khí lý tưởng, có giá trị $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, và T là nhiệt độ tuyệt đối tính theo thang độ K, F là hằng số Faraday, có giá trị

$96.485 \text{ C mol}^{-1}$. $C_O(x,t)$ và $C_R(x,t)$ là nồng độ chất oxy hóa và chất khử ở thời điểm t và cách bề mặt điện cực một khoảng bằng x . D_O và D_R lần lượt là hệ số khuếch tán của chất oxy hóa và chất khử. D là hệ số khuếch tán của cặp chất oxy hóa khử, và giả sử $D=D_O=D_R$. C_O và D_R lần lượt là nồng độ của chất oxy hóa và chất khử. C là nồng độ của cặp chất oxy hóa khử, và giả sử $C=C_O=C_R$.



Hình 2.9. Mạch tương đương Randles và phổ tổng trở: (a, b) tại vùng tần số cao; (c, d) tại vùng tần số thấp.

Hình 2.9 biểu diễn mạch tương đương Randles và phổ tổng trở: tại vùng tần số cao (Hình 2.9a, b) và tại vùng tần số thấp (Hình 2.9c, d) [100].

- **Tại vùng tần số cao** ($\omega \rightarrow \infty$): điện trở truyền điện tích R_{CT} và điện dung lớp kép C_{dl} chiếm ưu thế. Phương trình (2.9) và (2.10) được biểu diễn như sau:

$$Z' = R_s + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2} \quad (2.12)$$

$$Z'' = -\frac{\omega C_{dl} R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2} \quad (2.13)$$

Từ hai phương trình (2.12 và (2.13) suy ra:

$$(Z' - R_s - \frac{R_{CT}}{2})^2 + (Z'')^2 = \left(\frac{R_{CT}}{2}\right)^2 \quad (2.14)$$

Từ đó suy ra đồ thị $Z'' - Z'$ là một bán cung có tâm tại $Z' = R_s + (R_{CT}/2)$ và bán kính là $R_{CT}/2$. Bán cung cắt trục Z' tại R_s khi $\omega \rightarrow \infty$ và tại $(R_s + R_{CT})$ khi $\omega \rightarrow 0$ (Hình 2.9b).

- **Tại vùng tần số thấp ($\omega \rightarrow 0$):**

$$Z' = R_s + R_{ct} + \sigma \omega^{-1/2} \quad (2.15)$$

$$Z'' = -\sigma \omega^{-1/2} - 2\sigma^2 C_{dl} \quad (2.16)$$

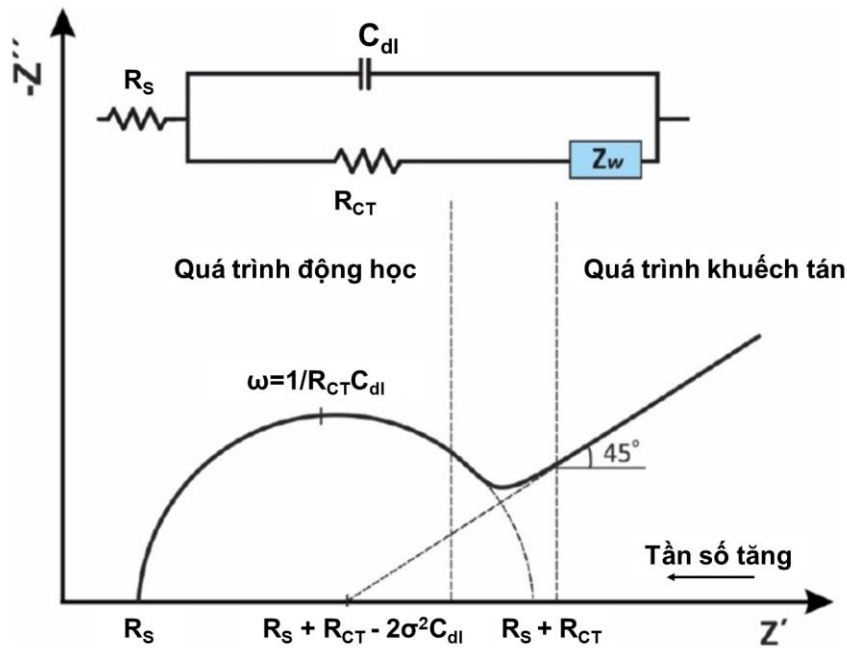
Từ hai phương trình (2.15) và (2.16) suy ra:

$$-Z'' = Z' - R_s - R_{ct} + 2\sigma^2 C_{dl} \quad (2.17)$$

Từ đó suy ra đồ thị $-Z'' - Z'$ là đường thẳng cắt trục Z' tại $(R_s + R_{ct} - 2\sigma^2 C_{dl})$ (Hình 2.9d). Trở kháng Warburg được biểu diễn theo công thức:

$$Z_W = \sigma \omega^{-1/2} - j(\sigma \omega^{-\frac{1}{2}}) \quad (2.18)$$

Thực nghiệm đo phổ tổng trở trên dải tần số rộng, từ vùng tần số cao đến vùng tần số thấp, tín hiệu thu được phản ánh đồng thời quá trình truyền điện tích và quá trình khuếch tán. Vì vậy, đồ thị Nyquist bao gồm phần bán cung ở vùng tần số cao và phần tuyến tính ở vùng tần số thấp (**Hình 2.10**).



Hình 2.10. Mạch tương đương Randles và phổ tổng trở khi quét trên dải rộng từ tần số cao đến thấp.

2.4. Nguyên lý hệ thống đo lường điện hoá và ứng dụng xử lý, truyền/thu tín hiệu

2.4.1. Cấu trúc hệ thống

Việc tích hợp cảm biến điện hóa với các nền tảng IoT và thiết bị di động đã mở ra hướng phát triển mới cho các hệ thống giám sát và chẩn đoán bệnh di động, thân thiện với người dùng. Ứng dụng công nghệ điện thoại thông minh kết hợp cảm biến điện hóa cho phép phân tích dữ liệu theo thời gian thực, giám sát từ xa và chia sẻ dữ liệu nhanh chóng, hỗ trợ chẩn đoán bệnh hoặc giám sát môi trường trong nuôi trồng thủy sản [101].

Một hệ thống đo điện hóa hoàn chỉnh thường bao gồm ba khối chức năng chính [102]:

(1) Phần tử nhận dạng sinh học: phát hiện đặc hiệu mục tiêu sinh học.

Phần tử nhận dạng sinh học là các cảm biến có bề mặt điện cực được chức năng hóa bằng đầu thu sinh học đặc hiệu, cho phép nhận biết và liên kết chọn lọc với mục tiêu.

(2) Mạch xử lý tín hiệu: chuyển đổi tín hiệu sinh học thành tín hiệu điện có thể đo được.

Mạch xử lý tín hiệu sử dụng các mô-đun đo điện hóa như AD5940ELCZ hoặc LMP91000, cho phép điều khiển các phép đo điện hóa.

(3) Hệ thống thu nhận và xử lý dữ liệu: chuyển đổi tín hiệu đo được thành tín hiệu đọc được, hiển thị kết quả và truyền dữ liệu.

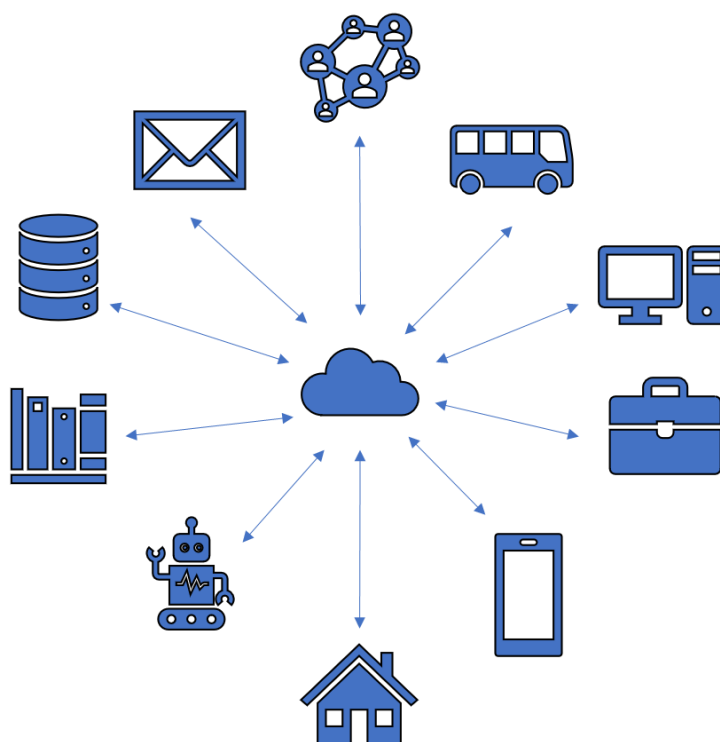
Hệ thống thu nhận và xử lý dữ liệu bao gồm mạch điều khiển, phần mềm xử lý, và ứng dụng người dùng.

- Mạch điều khiển: sử dụng các bo mạch mở rộng Arduino Uno hoặc ESP8266/ESP32 có khả năng kết nối Wi-Fi để truyền và thu dữ liệu.
- Phần mềm xử lý: được phát triển trên nền tảng Matlab hoặc Python, phục vụ việc thu nhận, xử lý và trực quan hóa tín hiệu điện hóa.
- Ứng dụng người dùng: được phát triển bằng MIT App Inventor, cho phép người dùng tương tác, giám sát và hiển thị dữ liệu trên thiết bị di động thông minh. Ngoài ra, các nền tảng trực quan khác như Thunkable, Kodular hoặc FlutterFlow cũng có thể được sử dụng, giúp mở rộng khả năng thiết kế giao diện, xử lý dữ liệu và tích hợp với phân cứng IoT.

2.4.2. Truyền thông

2.4.2.1. IoT

Internet of Things (IoT) (Hình 2.11) là một hệ thống gồm các thiết bị vật lý được kết nối với nhau thông qua Internet, cho phép thu thập, trao đổi, xử lý và phản hồi dữ liệu một cách tự động. IoT bao gồm ba thành phần chính: thiết bị, mạng truyền thông và hệ thống điều khiển [103], [104].



Hình 2.11. Mô hình khái quát về IoT (Internet of Things) kết nối vạn vật [104].

- Thiết bị: là các vật thể vật lý có khả năng kết nối Internet như tủ lạnh, ô tô, đèn, tivi hoặc máy móc công nghiệp, được tích hợp cảm biến, bộ xử lý và mô-đun truyền thông. Các thiết bị này có thể thu thập dữ liệu từ môi trường, truyền dữ liệu tới hệ thống xử lý trung tâm, đồng thời nhận lệnh điều khiển để thực hiện các tác vụ cụ thể.

- Mạng truyền thông: đóng vai trò kết nối và trao đổi dữ liệu giữa các thiết bị và hệ thống điều khiển, thông qua các công nghệ như Wi-Fi, Bluetooth, ZigBee, LoRa, Ethernet hoặc mạng di động 4G/5G, tùy theo yêu cầu về phạm vi, tốc độ và mức tiêu thụ năng lượng.

- Hệ thống điều khiển: là bộ phận trung tâm của IoT, có nhiệm vụ xử lý dữ liệu nhận được, ra quyết định điều khiển, và gửi phản hồi đến thiết bị hoặc người dùng. Hệ thống này có thể được triển khai dưới dạng vi điều khiển (Arduino, ESP8266), máy chủ biên (edge server), nền tảng đám mây (cloud platform), phần mềm điều khiển trên máy tính hay thiết bị di động.

Công nghệ IoT (Internet of Things) đang cách mạng hóa nhiều lĩnh vực [105]–[107], trong đó cảm biến sinh học điện hóa là một trong những ứng dụng nổi bật. Cảm biến sinh học điện hóa kết hợp giữa kỹ thuật sinh học và kỹ thuật điện hóa để phát hiện và định lượng các đối tượng sinh học. Khi tích hợp với IoT, các cảm biến này có khả năng truyền tải dữ liệu liên tục và từ xa, cho phép giám sát và phân tích thời gian thực. Ứng dụng này mở ra nhiều tiềm năng trong y tế, nghiên cứu khoa học và quản lý môi trường, giúp nâng cao độ chính xác, tốc độ phản hồi và khả năng xử lý dữ liệu, cải thiện hiệu quả hoạt động của thiết bị

Hoạt động trên nền tảng công nghệ IoT tiên tiến và hữu ích [103], các kết quả đo và tính toán nồng độ theo thời gian thực có thể truy cập và phân tích thuận tiện trên cả máy tính và thiết bị thông minh, được hỗ trợ bởi các tùy chọn kết nối có dây hoặc không dây. Hệ thống đo lường điện hóa hoạt động trên nền tảng IoT cung cấp một giải pháp hứa hẹn cho việc phát hiện VP28 tại chỗ trong nuôi tôm, mang lại nền tảng di động, thân thiện với người dùng và có độ nhạy cao để hỗ trợ quản lý và kiểm soát các đợt bùng phát WSSV.

2.4.2.2. MQTT

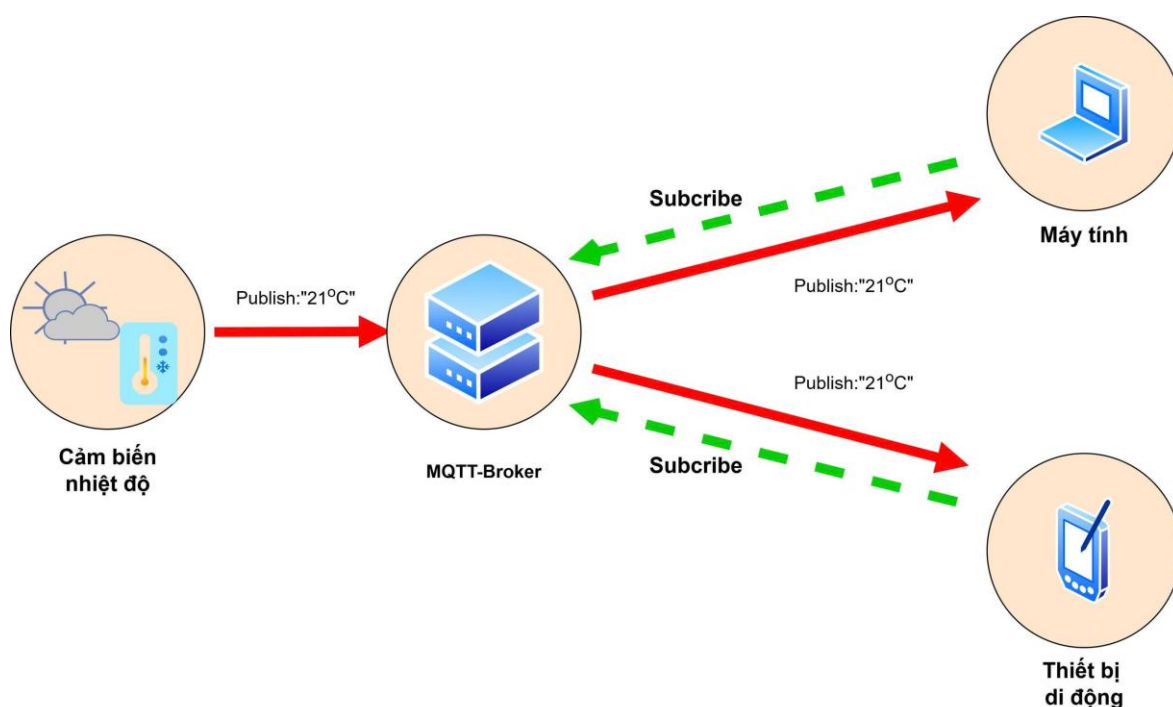
MQTT (Message Queuing Telemetry Transport) là giao thức truyền thông theo mô hình publish/subscribe, được tối ưu hóa cho các thiết bị IoT với yêu cầu băng thông thấp, độ tin cậy cao và khả năng hoạt động trong môi trường mạng không ổn định. MQTT sử dụng máy chủ trung gian (broker) có yêu cầu tài nguyên thấp, giúp xử lý tác vụ hiệu quả mà không cần phần cứng mạnh. Giao thức này có tính mở, đơn giản và dễ triển khai, phù hợp cho nhiều ứng dụng khác nhau.

MQTT được phát minh bởi Andy Stanford-Clark (IBM) và Arlen Nipper (EUROTECH) vào năm 1999, với mục tiêu tạo ra một giao thức tiêu tốn ít năng lượng và băng thông để kết nối đến đường ống dẫn dầu qua vệ tinh. Năm 2011, IBM và Eurotech đã chuyển MQTT cho dự án mã nguồn mở Eclipse Paho, và đến năm 2013, MQTT được chuẩn hóa bởi OASIS (Organization for the Advancement of Structured Information Standards) [108].

MQTT gồm các thành phần: Client: thiết bị thực hiện gửi hoặc nhận dữ liệu; Publisher: nơi gửi thông điệp (message); Subscriber: nơi nhận thông điệp; Broker: máy chủ trung gian, tiếp nhận thông điệp từ Publisher và chuyển đến Subscriber. Broker còn có thể thực hiện các tính năng bảo mật, lưu trữ hoặc ghi log [109].

Các MQTT Clients tương thích với hầu hết hệ điều hành hiện có như Windows, Linux, Android, iOS, ... Giao thức này sử dụng băng thông thấp nên lý tưởng cho ứng dụng IoT. Trong nghiên cứu này, Mosquitto được sử dụng làm MQTT broker chính, chạy trên máy tính hệ điều hành Windows.

Hình 2.12 minh họa giao thức truyền thông MQTT hoạt động theo cơ chế publish/subscribe thông qua máy chủ trung gian (broker). Trong hình, cảm biến nhiệt độ đóng vai trò publisher, gửi dữ liệu đo được ("21 °C") đến MQTT broker. Các thiết bị như máy tính hoặc thiết bị di động, sau khi subscribe tới chủ đề (topic) tương ứng, sẽ nhận dữ liệu do broker phân phối. Cơ chế này giúp giảm tải kết nối trực tiếp giữa các thiết bị, tối ưu băng thông, đồng thời đảm bảo khả năng truyền dữ liệu nhanh, tin cậy và mở rộng linh hoạt trong các hệ thống IoT.



Hình 2.12. Mô hình truyền thông MQTT theo cơ chế Publish/Subscribe.

Mosquitto là một MQTT Broker mã nguồn mở [110] hỗ trợ phiên bản 5.0, 3.1.1 và 3.1, cho phép giao tiếp publish/subscribe nhanh, nhẹ, phù hợp với các hệ thống nhúng. Mosquitto cung cấp thư viện viết bằng ngôn ngữ C và có thể dùng dòng lệnh: “*mosquitto_pub*” và “*mosquitto_sub*”. Ngoài ra, Mosquitto cũng là một phần của Eclipse Foundation trong dự án iot.eclipse.org.

- Ưu điểm:

- + Tốc độ truyền và xử lý dữ liệu nhanh, độ ổn định cao.
- + Dễ triển khai, tương thích nhiều nền tảng, phù hợp thiết bị nhúng.
- + Hỗ trợ các giao thức bảo mật TLS/SSL nhằm xác thực máy chủ và thiết bị khách, đồng thời mã hóa dữ liệu trong quá trình truyền.

- Nhược điểm:

- + Việc triển khai trên các hệ thống quy mô lớn có thể phức tạp.
- + Nếu không được cấu hình đầy đủ các cơ chế bảo mật TLS/SSL, xác thực người dùng và phân quyền truy cập, hệ thống có thể tồn tại các rủi ro về bảo mật.

Trong nghiên cứu này, MQTT được sử dụng để truyền dữ liệu theo thời gian thực giữa thiết bị đo và ứng dụng giám sát, đáp ứng yêu cầu theo dõi liên tục. Đối với các ứng dụng giám sát từ xa qua Internet, hệ thống cần tích hợp các cơ chế bảo mật TLS/SSL, xác thực người dùng và phân quyền truy cập nhằm bảo vệ dữ liệu trong quá trình truyền và ngăn chặn truy cập trái phép.

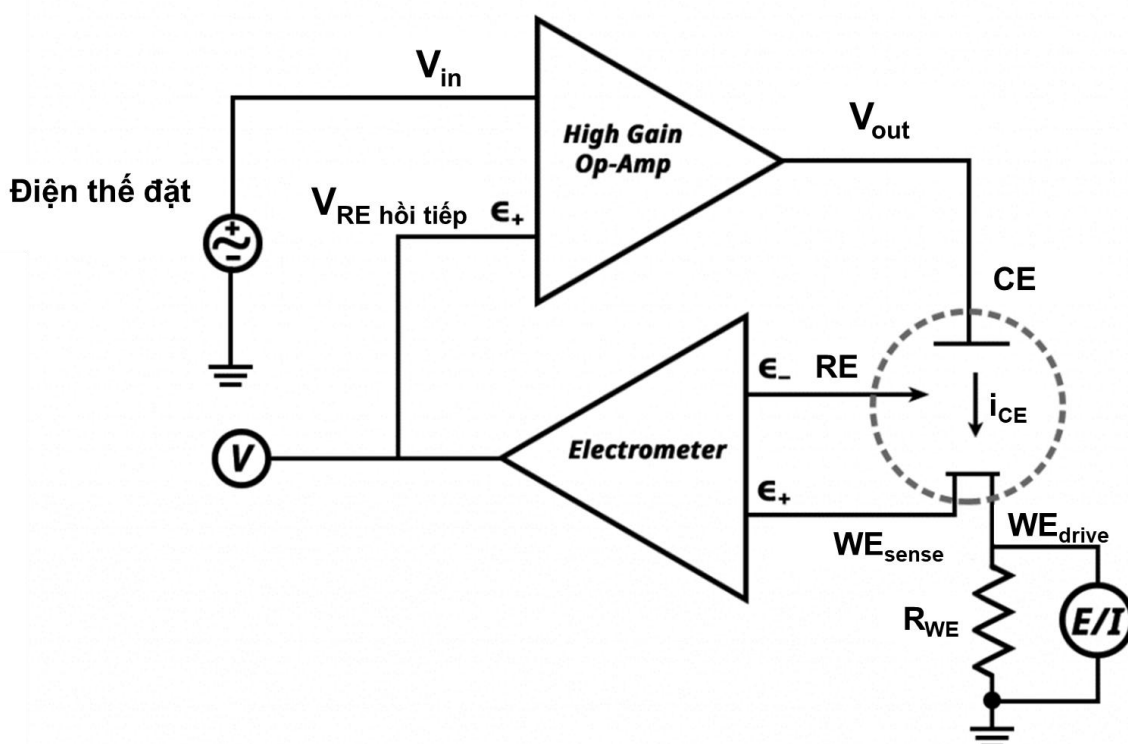
2.4.3. Phân cứng điều khiển và thu thập dữ liệu

2.4.3.1. Potentiostat

Hệ ba điện cực trong Potentiostat bao gồm:

- Điện cực làm việc WE (Working Electrode): nơi diễn ra phản ứng oxi hóa–khử, là vị trí thu nhận thông tin điện hóa của mẫu.
- Điện cực so sánh RE (Reference Electrode): cung cấp điện thế chuẩn ổn định, đảm bảo phép đo có độ chính xác cao và không cho dòng điện chạy qua.

Potentiostat là thiết bị điện hóa được sử dụng để duy trì điện thế không đổi giữa điện cực làm việc và điện cực so sánh trong một hệ ba điện cực, đồng thời đo dòng phản ứng xảy ra tại điện cực làm việc. Thiết bị này đóng vai trò trung tâm trong các phép đo điện hóa giúp xác định đặc tính động học và cơ chế phản ứng oxi hóa–khử xảy ra trên bề mặt điện cực.



Hình 2.13 mô tả sơ đồ mạch Potentiostat cơ bản vận hành dựa trên nguyên tắc phản hồi âm (negative feedback) [111]. Bộ khuếch đại thuật toán có độ lợi cao (High-Gain Op-Amp) điều chỉnh điện áp V_{out} sao cho điện thế giữa WE và RE luôn khớp với giá trị điện thế đặt trước V_{in} . Trong quá trình này, điện cực đối CE sẽ cấp hoặc thu dòng điện cần thiết để duy trì điện thế mong muốn tại điện cực làm việc.

73

việc. Giá trị của dòng này thay đổi theo tốc độ phản ứng điện hóa, nồng độ chất oxy hóa–khử trong dung dịch, và điện thế áp dụng. Khi điện thế được điều chỉnh, dòng i_{CE} biểu thị trực tiếp hoạt tính điện hóa của hệ, qua đó được sử dụng để phân tích đặc trưng vật liệu, động học phản ứng hoặc khả năng xúc tác của điện cực.

Đồng thời, bộ đo điện thế có trở kháng cao Electrometer được sử dụng để đo chính xác hiệu điện thế giữa WE và RE mà không gây ảnh hưởng đến trạng thái điện hóa của hệ. Tín hiệu phản hồi $V_{RE \text{ hồi tiếp}}$ thu được từ Electrometer được đưa trở lại bộ khuếch đại, tạo nên vòng điều khiển phản hồi âm kín, giúp giữ ổn định điện thế làm việc, đồng thời đảm bảo mối quan hệ chính xác giữa điện thế áp dụng và dòng điện phản ứng, đây chính là cơ sở hoạt động của các kỹ thuật đo điện hóa.

Dòng điện tại điện cực làm việc không được đo trực tiếp, mà được tính thông qua điện áp rơi V trên điện trở đo dòng R_{WE} nối giữa WE_{drive} và đất. Vì R_{WE} có giá trị biết trước, nên dòng điện i có thể được tính bằng định luật Ohm:

$$i = \frac{V}{R_{WE}} \quad (2.19)$$

Trong đó: i là dòng điện tại điện cực làm việc, V là điện áp đo được trên R_{WE} , R_{WE} là điện trở đã biết giá trị.

Như vậy, Potentiostat điều khiển và duy trì điện thế giữa điện cực làm việc và điện cực so sánh, dòng điện qua điện cực làm việc được xác định gián tiếp thông qua điện trở R_{WE} . Điện thế áp dụng được xác định bởi điện thế đặt V_i . Điện thế tại điện cực làm việc V được đo bởi Electrometer. Dòng điện được tính bằng vôn kế (E/I) qua R_{WE} . Nhờ cơ chế phản hồi của op-amp, Potentiostat có thể điều chỉnh điện thế của điện cực làm việc so với điện cực so sánh đồng thời đo dòng điện sinh ra, đây chính là nguyên lý cốt lõi của các kỹ thuật voltammetry trong điện hóa học.

Tóm lại Potentiostat thực hiện ba nhiệm vụ cơ bản:

- Duy trì điện thế ổn định giữa điện cực làm việc và điện cực so sánh theo giá trị đặt trước.

- Ghi nhận và phân tích dòng điện phản ứng, cung cấp thông tin về quá trình oxi hóa–khử.

- Tạo dạng sóng kích thích thích hợp (tuyến tính, vuông, hoặc sin) phục vụ cho các kỹ thuật điện hóa khác nhau như CV, SWV hay EIS.

2.4.3.2. Mạch điều khiển

Vi điều khiển đóng vai trò trung tâm trong việc điều khiển, thu thập và xử lý tín hiệu của mạch Potentiostat. Thiết bị này được lập trình để tạo ra các dạng sóng điện áp điều khiển (như tuyến tính, vuông, hoặc hình sin) áp dụng lên điện cực làm việc thông qua bộ khuếch đại thuật toán, đồng thời đọc tín hiệu phản hồi điện thế và dòng điện thu được từ hệ điện hóa. Dữ liệu đo được số hóa thông qua bộ chuyển đổi ADC tích hợp và gửi đến máy tính hoặc ứng dụng hiển thị thông qua giao thức truyền thông như UART, SPI, I²C hoặc MQTT.

Nhờ có vi điều khiển, hệ Potentiostat có thể tự động hóa quá trình đo, điều chỉnh điện thế theo thời gian thực, và lưu trữ, truyền dữ liệu trực tiếp hoặc qua nền tảng IoT đến phần mềm xử lý. Các module tích hợp vi điều khiển thường được sử dụng gồm Arduino, ESP32 hoặc STM32, nhờ có tốc độ xử lý cao, độ chính xác ADC tốt, và tích hợp Wi-Fi/Bluetooth phục vụ cho các ứng dụng đo điện hóa thông minh.

Arduino IDE (Integrated Development Environment) [112] là môi trường phát triển tích hợp cho phép viết mã, biên dịch và nạp chương trình điều khiển cho các vi điều khiển như Arduino Uno, ESP32 hoặc các bo mạch mở rộng tương thích khác. Môi trường này hỗ trợ nhiều thư viện giao tiếp tiêu chuẩn như SPI, UART và I²C, giúp thiết lập kết nối giữa cảm biến điện hóa và hệ thống xử lý trung tâm. Nhờ khả năng tương thích cao, giao diện thân thiện và kho thư viện phong phú, Arduino IDE được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và phát triển các hệ thống đo lường điện hóa tích hợp IoT, cho phép điều khiển quá trình đo, thu nhận và truyền dữ liệu một cách linh hoạt.

Trong hệ thống đo điện hóa của nghiên cứu này, Arduino IDE được sử dụng để xây dựng chương trình điều khiển quá trình đo, thu nhận, truyền và xử lý dữ liệu thông qua kết nối Wi-Fi sử dụng giao thức MQTT hoặc qua cổng nối tiếp (serial) sử dụng giao thức UART đến hệ thống xử lý trung tâm.

2.4.4. Phần mềm xử lý và hiển thị dữ liệu

2.4.4.1. Python

Python là một ngôn ngữ lập trình bậc cao, đa mục đích, được phát triển bởi Guido van Rossum và ra mắt lần đầu vào năm 1991. Ngôn ngữ này được thiết kế với ưu điểm nổi bật là cú pháp rõ ràng, dễ đọc, dễ học và dễ ghi nhớ, nhờ đó đặc biệt phù hợp cho cả người mới bắt đầu lẫn các lập trình viên chuyên nghiệp. Với cú pháp rõ ràng và khả năng mở rộng linh hoạt, Python hỗ trợ mạnh mẽ trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là khoa học dữ liệu và kỹ thuật. Nhờ hệ sinh thái thư viện phong phú như NumPy, Matplotlib, Pandas, PySerial, ... Python cho phép xử lý, phân tích và trực quan hóa dữ liệu một cách hiệu quả [113].

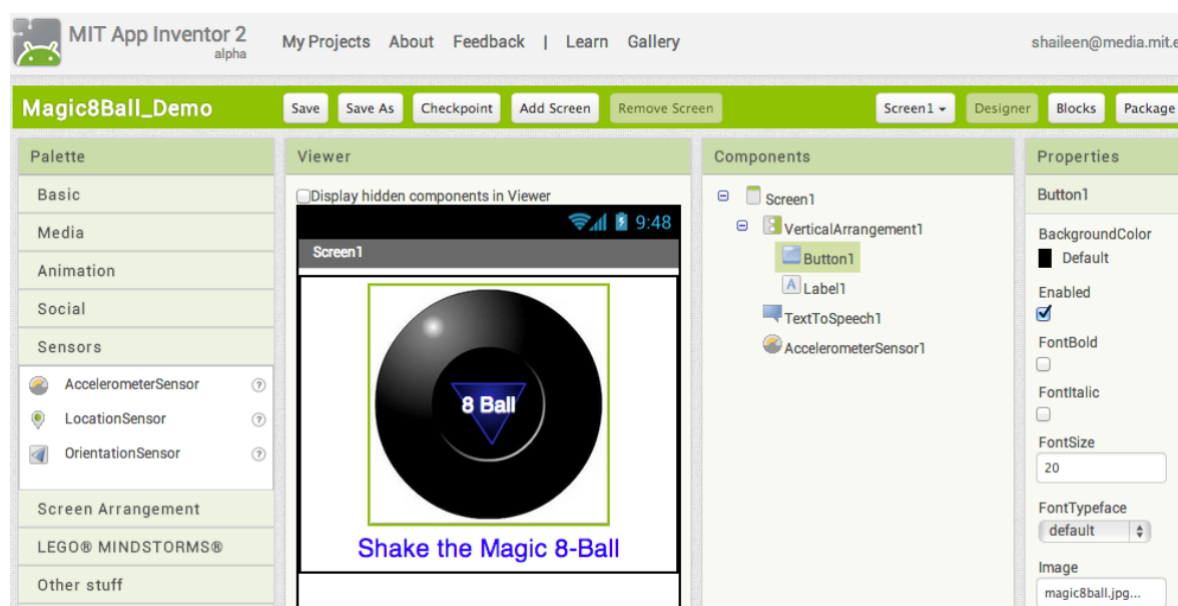
Trong hệ thống đo điện hóa của nghiên cứu này, Python được ứng dụng để xây dựng phần mềm thu thập dữ liệu từ các cổng giao tiếp, xử lý tín hiệu đo, trích xuất, tính toán các thông số điện hóa (điện thế đỉnh, dòng đỉnh và nồng độ dung dịch đo), đồng thời hiển thị kết quả, dữ liệu dưới dạng biểu đồ thời gian thực, góp phần nâng cao độ chính xác và hiệu quả trong quá trình phân tích. Đồng thời, Python hỗ trợ làm việc với giao thức MQTT thông qua thư viện *paho-mqtt*, giúp gửi và nhận dữ liệu đến các nền tảng IoT hoặc ứng dụng người dùng.

Ngoài ra, PyCharm là một môi trường phát triển tích hợp IDE được sử dụng phổ biến trong phát triển các ứng dụng Python. Trong nghiên cứu này, PyCharm được sử dụng làm môi trường phát triển và thực thi chương trình đo điện hóa theo thời gian thực. Công cụ này cho phép viết, kiểm thử và chạy trực tiếp mã nguồn trước khi biên dịch thành tệp thực thi (.exe), đồng thời hỗ trợ quản lý thư viện, tạo môi trường ảo và tổ chức mã nguồn hiệu quả. PyCharm cũng tích hợp các tính năng kiểm tra cú pháp, gợi ý thông minh và phát hiện lỗi, giúp hoàn thiện quy trình phát triển phần mềm.

2.4.4.2. MIT App Inventor

MIT App Inventor là nền tảng trực tuyến mã nguồn mở được phát triển bởi MIT (Massachusetts Institute of Technology), cho phép thiết kế ứng dụng di động thông qua giao diện kéo–thả trực quan. Giao diện của MIT App Inventor được mô tả trên Hình 2.14. Nền tảng này hỗ trợ tư duy lập trình khối [114], phù hợp cho việc phát triển nhanh các ứng dụng giám sát và hiển thị dữ liệu trong nghiên cứu cảm biến điện hóa.

MIT App Inventor dựa trên trình soạn thảo web “What You See Is What You Get” (WYSIWYG), hỗ trợ cả Android và iOS, được xây dựng trên Google Blockly và lấy cảm hứng từ StarLogo TNG [115] và Scratch [116], [117]. Cho đến nay, 6,8 triệu người tại hơn 190 quốc gia đã sử dụng App Inventor để xây dựng hơn 24 triệu ứng dụng.



Hình 2.14. MIT App Inventor – Nền tảng hỗ trợ phát triển ứng dụng di động [118] .

Nền tảng này cũng được mở rộng để phục vụ các nhóm người dùng đặc thù, và trong nghiên cứu này, được sử dụng để xây dựng giao diện hiển thị dữ liệu điện hóa, giúp người dùng dễ dàng quan sát và giám sát kết quả đo trên thiết bị di động thông minh theo thời gian thực.

Kết luận chương

Chương 2 đã trình bày cơ sở lý thuyết và nguyên lý phát triển hệ thống cảm biến sinh học điện hóa phát hiện WSSV. Các nội dung bao gồm quy trình chức năng hóa điện cực thông qua phủ hạt nano vàng, hình thành lớp SAM, và cố định đầu thu sinh học kháng thể để nhận biết chọn lọc đối tượng mục tiêu. Nguyên lý các phương pháp điện hóa dùng để ghi nhận sự thay đổi tín hiệu, cũng như cấu trúc hệ thống đo lường và nền tảng phần mềm tích hợp IoT cho phép truyền và giám sát dữ liệu theo thời gian thực cũng được trình bày trong chương này.

Những cơ sở lý thuyết và nguyên lý này là nền tảng cho thiết lập thực nghiệm hệ thống về chức năng hoá điện cực cố định kháng thể anti-VP28, phát hiện VP28 – chỉ dấu sinh học WSSV; thiết kế, triển khai hệ thống đo lường điện hóa phát hiện WSSV trong các chương tiếp theo.

CHƯƠNG 3. THIẾT LẬP THỰC NGHIỆM HỆ THỐNG CẢM BIẾN ĐIỆN HOÁ PHÁT HIỆN BỆNH TÔM ĐÓM TRẮNG DO VI-RÚT WSSV

Dựa trên cơ sở lý thuyết và nguyên lý phát triển đã cung cấp ở các chương trước, trong chương này, tác giả trình bày các phương pháp thực nghiệm và quy trình nghiên cứu sử dụng để tổng hợp vật liệu, biến tính bề mặt điện cực và phát triển cảm biến điện hóa phát hiện WSSV. Cụ thể, các quy trình thực nghiệm chính được xây dựng và minh họa trên Hình 3.1, bao gồm: (i) quy trình chức năng hóa điện cực vàng SPAuE thực hiện trên cặp hóa chất thử anti-BSA và BSA-FITC nhằm khảo sát các phép đo ban đầu, đánh giá khả năng hình thành lớp SAM, hiệu quả cố định kháng thể và khả năng bắt giữ kháng nguyên, được xác nhận thông qua đánh giá tín hiệu quang, điện; (ii) quy trình chức năng hóa điện cực cacbon SPCE phủ AuNPs để phát hiện protein VP28 tinh khiết sử dụng hệ đo thương mại; (iii) quy trình chức năng hóa điện cực vàng SPAuE phát hiện protein VP28 tinh khiết trên hệ đo điện hóa tự xây dựng WPEMS; và (iv) quy trình chức năng hóa điện cực vàng SPAuE phát hiện WSSV trên mẫu sinh học thực (PCR dương tính), qua đó đánh giá khả năng ứng dụng thực tế của hệ cảm biến.

Kỹ thuật điện hóa quét thế tuần hoàn CV được sử dụng trong hai giai đoạn: (i) tổng hợp hạt nano vàng (AuNPs) trên nền điện cực cacbon nhằm tăng cường khả năng dẫn điện và diện tích bề mặt hoạt hóa; (ii) đánh giá đặc tính điện hóa của bề mặt điện cực sau từng giai đoạn biến tính và trong quá trình khảo sát hoạt động của cảm biến. Bên cạnh đó, phổ tổng trở điện hoá EIS, vôn-ampe sóng vuông SWV được sử dụng để phân tích sự thay đổi đặc trưng điện hóa của cảm biến sau từng bước chức năng hóa và trong quá trình phát hiện protein mục tiêu. Để khảo sát hình thái và thành phần vật liệu, kính hiển vi điện tử quét SEM và phổ tán sắc năng lượng EDX được sử dụng nhằm đánh giá sự phân bố của hạt nano vàng và tính đồng nhất của lớp phủ trên bề mặt điện cực. Ngoài ra, phương pháp Western Blot được áp dụng để xác nhận tính đặc hiệu của liên kết giữa kháng thể anti-VP28 và kháng nguyên VP28, đảm bảo độ chọn lọc sinh học của cảm biến được phát triển. Các phương pháp

trên được phối hợp trong quy trình nghiên cứu nhằm xây dựng, thử nghiệm và đánh giá hiệu năng của hệ thống cảm biến điện hóa phát hiện WSSV.

Bên cạnh đó, chương này trình bày thiết kế, xây dựng hệ thống đo điện hóa di động, không dây WPEMS (Wireless Portable Electrochemical Measurement System) phục vụ phát hiện tại chỗ VP28 – protein vỏ đặc trưng của WSSV. Hệ thống gồm: (i) cảm biến miễn dịch điện hóa (dạng điện cực có cấu trúc ba điện cực với bề mặt điện cực làm việc là Au được phủ lớp SAM nhằm cố định kháng thể anti-VP28), (ii) mạch đo và điều khiển tích hợp (ESP32 + LMP91000 + ADS1115, lọc số), và (iii) giao diện người dùng trên máy tính Windows và điện thoại Android kết nối MQTT để hiển thị–lưu trữ dữ liệu thời gian thực.

3.1. Khảo sát tốc độ quét và bước thế (E step) trong quét CV của điện cực vàng

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số điện cực đến đặc tính tín hiệu, hệ ba điện cực của điện cực vàng SPAuE trần được khảo sát trong dung dịch điện ly. Dung dịch điện ly gồm hỗn hợp Kali Ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) 5 mM, Kali Ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6$) 5 mM và Kali Clorua (KCl) 0,1 M pha trong nước khử ion DI.

Trong kỹ thuật quét thế tuần hoàn (CV), việc lựa chọn bước thế (E step) và tốc độ quét có ảnh hưởng đáng kể đến độ chính xác và hình dạng của tín hiệu. Cụ thể, E step càng nhỏ thì độ phân giải tín hiệu càng cao, nhưng đồng thời thời gian hoàn thành một chu kỳ quét cũng tăng lên, dẫn đến kéo dài tổng thời gian đo. Theo phương trình Randles–Sevcik, tốc độ quét càng lớn thì đỉnh dòng CV càng cao, tuy nhiên nếu tăng quá mức có thể gây nhiễu tín hiệu.

Do đó, điện cực SPAuE trần được khảo sát tại các tốc độ quét cố định trong dải bước thế từ 2 đến 15 mV, đồng thời ghi nhận giá trị dòng điện cực đại của đỉnh anốt. Các phép quét được lặp lại với tốc độ quét tăng dần để đánh giá ảnh hưởng của tham số này. E step và tốc độ quét được lựa chọn dựa trên giá trị dòng cực đại thu được và khả năng lặp lại của tín hiệu.

QUY TRÌNH THỰC NGHIỆM CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC PHÁT HIỆN WSSV



TRÊN HỆ ĐO THƯƠNG MẠI PALMSENS4/CS350M



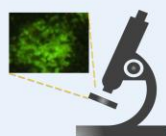
1. CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC VÀNG SPAUE PHÁT HIỆN BSA-FITC



ĐO LƯỜNG VÀ
PHÂN TÍCH



TÍN HIỆU ĐIỆN

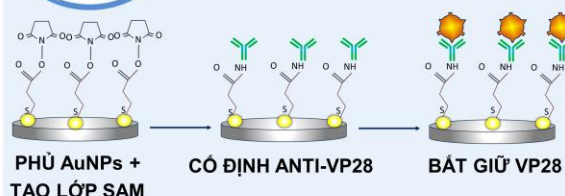


TÍN HIỆU QUANG

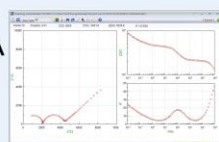
Dải nồng độ đo 0,5 - 8,0 μM



2. CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC CACBON SPCE PHÁT HIỆN VP28



ĐO LƯỜNG VÀ
PHÂN TÍCH



KIỂM TRA
GẮN KẾT
ANTI-VP28 +
VP28

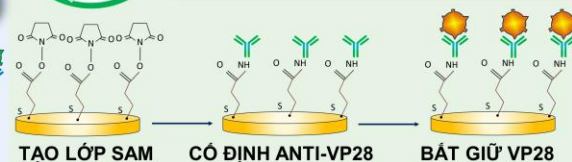
Dải nồng độ đo 10 - 60 ng/mL



TRÊN HỆ ĐO TỰ XÂY DỰNG WPEMS



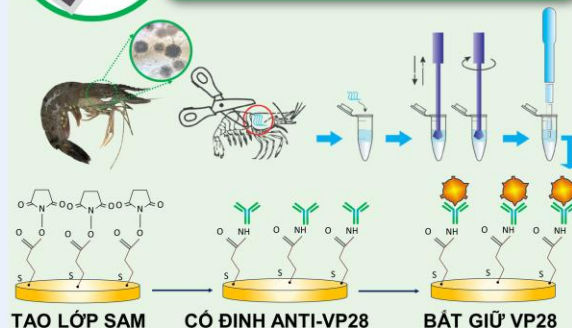
3. CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC VÀNG SPAUE PHÁT HIỆN VP28



Dải nồng độ đo 5 - 25 ng/mL



4. CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC VÀNG SPAUE PHÁT HIỆN WSSV



Mẫu WSSV (+) (PCR)

Hình 3.1. Quy trình thực nghiệm chức năng hóa điện cực phát hiện WSSV trên hệ đo thương mại và hệ đo tự xây dựng (WPEMS).

3.2. Xây dựng quy trình chức năng hoá điện cực

3.2.1. Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC

BSA-FITC (Bovine Serum Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate) là một protein được gắn chất huỳnh quang, cho phép quan sát sự hiện diện của nó dưới kính hiển vi soi ngược huỳnh quang. Trong giai đoạn đầu của thí nghiệm, nhằm nghiên cứu cơ chế bắt cặp giữa kháng thể và kháng nguyên ở các dải nồng độ khác nhau, cặp hóa chất anti-BSA/BSA-FITC được sử dụng như một mô hình đối chứng để so sánh tín hiệu điện hóa và tín hiệu quang học.

Thí nghiệm chức năng hóa điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC được tiến hành để xây dựng, kiểm chứng và tối ưu quy trình biến tính bề mặt điện cực phục vụ các ứng dụng cảm biến sinh học điện hóa. Mục tiêu của giai đoạn này là đánh giá khả năng hình thành lớp SAM, cố định kháng thể, và phát hiện đặc hiệu kháng nguyên, từ đó xác nhận độ ổn định và độ nhạy của bề mặt điện cực trước khi áp dụng cho quy trình phát hiện protein VP28, chỉ dấu đặc trưng của vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên tôm nuôi.

Trong nghiên cứu này, hai hợp chất chứa nhóm thiol gồm 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) và L-Cysteine được lựa chọn để hình thành lớp SAM trên điện cực vàng SPAuE. Cả hai loại SAM đều được khảo sát theo cùng một quy trình gồm các bước: hình thành SAM, hoạt hóa cố định kháng thể anti-BSA, gắn kháng nguyên BSA-FITC, và phân tích tín hiệu bằng các kỹ thuật huỳnh quang, SEM/EDX, CV, SWV và EIS.

Các kết quả chi tiết của quy trình chức năng hoá điện cực biến tính bằng MUA được trình bày trong mục 4.2.1, kết quả tương ứng của L-Cysteine được tổng hợp riêng trong Phụ lục 1, nhằm giữ trọng tâm và bảo đảm tính nhất quán cho việc áp dụng quy trình với SAM MUA trong các giai đoạn tiếp theo về phát triển thiết bị chẩn đoán bệnh tôm đốm trắng do vi-rút. Quy trình này đóng vai trò nền tảng thực nghiệm cho toàn bộ nghiên cứu, là cơ sở để phát triển quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein VP28 ở các phần tiếp theo, đồng thời giúp đánh giá

ảnh hưởng của các hợp chất thiol đến đặc tính truyền điện tích và khả năng nhận biết sinh học của hệ cảm biến.

3.2.1.1. Hoá chất và thiết bị

a. Hoá chất

11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) và (R)-2-amino-3-mercaptopropionic acid (L-Cysteine) được sử dụng để hình thành lớp đơn tự sắp xếp SAM. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) được dùng để hoạt hóa lớp SAM. Kháng thể Anti-Bovine Serum Albumin (anti-BSA) và Bovine Serum Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate (BSA-FITC) được sử dụng để khảo sát sự bắt cặp kháng thể – kháng nguyên. Tất cả các hóa chất đều của hãng Sigma–Aldrich (Hoa Kỳ).

Dung dịch phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4) 10X của hãng Gibco (Hoa Kỳ). Kali ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), kali ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) và kali clorua (KCl) của hãng Choneye Pure Chemicals (Đài Bắc, Đài Loan). Nước khử ion (DI water) có điện trở suất $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ lấy từ hệ thống PURIST® Ultrapure Water System (Rephile, Singapore).

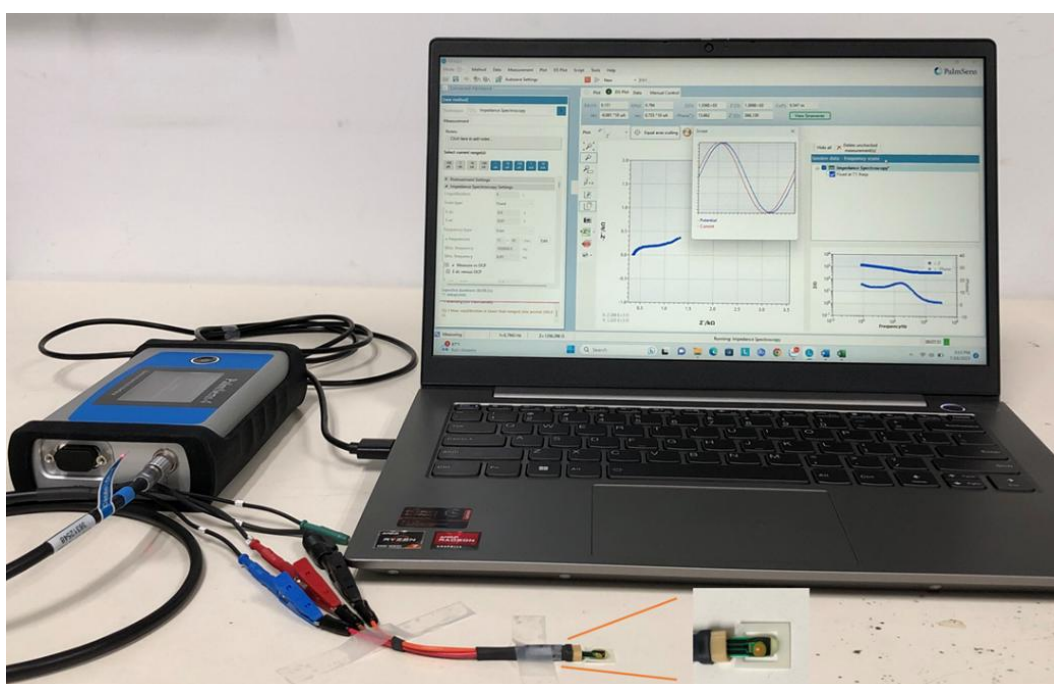
b. Điện cực

Điện cực vàng SPAuE (Screen-Printed Gold Electrode, loại ER-N) thuộc dòng DEP-Chip của hãng BioDevice Technology Ltd., Nhật Bản được sử dụng cho quá trình chức năng hóa bề mặt và các phép đo điện hóa. Trước khi biến tính, các điện cực được rửa năm lần bằng nước DI và làm khô nhẹ bằng khí nitơ nhằm loại bỏ tạp chất, đảm bảo sự hình thành lớp SAM đồng đều. Bước rửa và sấy khô này được áp dụng thống nhất trong tất cả các bước chức năng hóa và phát hiện protein của quy trình.

c. Thiết bị

Ảnh huỳnh quang được thu bằng kính hiển vi soi ngược huỳnh quang CKX41 tích hợp camera kỹ thuật số DP71 và phần mềm Olympus DP Controller

(Olympus, Tokyo, Nhật Bản). Các ảnh huỳnh quang thu được phân tích bằng phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Hoa Kỳ) để định lượng cường độ huỳnh quang. Hình thái bề mặt và thành phần nguyên tố của điện cực được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) kết hợp phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) sử dụng thiết bị COXEM EM-30AX SEM (COXEM Co., Ltd., Hàn Quốc). Các phép đo điện hóa được thực hiện bằng bộ đo điện hoá PalmSens4 kết nối với phần mềm PS Trace 5.9 (PalmSens BV, Hà Lan). Hình 3.2 mô tả kết nối của thiết bị đo PalmSens4 với điện cực SPAuE và phần mềm PS Trace 5.9 trên máy tính.

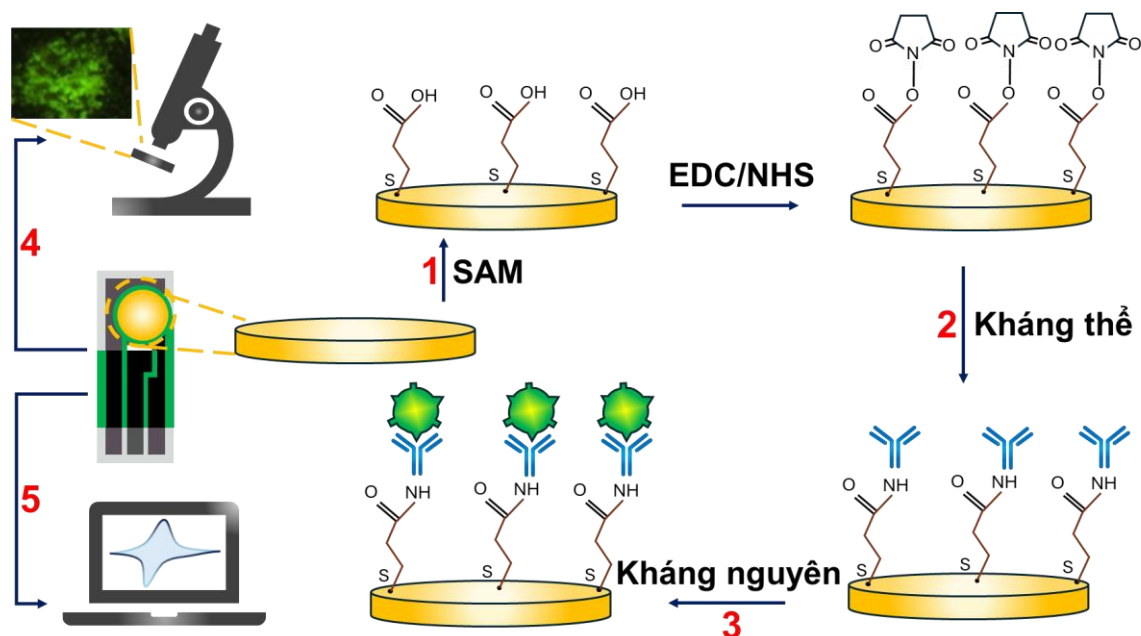


Hình 3.2. Kết nối thiết bị đo PalmSens4 với điện cực SPAuE và phần mềm PS Trace 5.9 trên máy tính.

3.2.1.2. Quy trình chức năng hóa điện cực, đánh giá bằng huỳnh quang, SEM/EDX và phép đo điện hóa

Hình 3.3 minh họa sơ đồ quy trình biến tính điện cực trên bề mặt vàng. Quy trình này bao gồm năm bước chính: (1) Hình thành lớp SAM MUA; (2) hoạt hóa lớp SAM bằng EDC/NHS và cố định kháng thể anti-BSA lên bề mặt điện cực; (3) bắt cặp đặc hiệu giữa kháng thể và protein BSA-FITC; (4) quan sát huỳnh quang và hình thái bề mặt để xác nhận sự gắn kết của protein, đồng thời đánh giá đặc điểm

hình thái và thành phần nguyên tố bằng các kỹ thuật SEM/EDX; và (5) thực hiện các phép đo điện hóa để phân tích tín hiệu phản hồi sau khi gắn kết sinh học.



Hình 3.3. Sơ đồ quá trình biến tính điện cực: (1) Tạo SAM MUA; (2) Hoạt hóa SAM, cố định kháng thể; (3) Bắt giữ kháng nguyên BSA-FITC; (4) Thu ảnh huỳnh quang và phân tích SEM/EDX; (5) Thực hiện phép đo điện hóa.

- Bước 1: Hình thành SAM.

Điện cực được ngâm qua đêm ở nhiệt độ phòng trong dung dịch MUA có nồng độ 5 mM, pha trong ethanol. Các nhóm thiol trong hợp chất MUA hình thành liên kết cộng hóa trị Au-S với bề mặt vàng. Sau đó, điện cực được rửa kỹ để loại bỏ các phân tử không gắn kết.

- Bước 2: Hoạt hóa SAM và cố định kháng thể.

Nhỏ 3,0 μL hỗn hợp gồm 0,4 M EDC và 0,2 M NHS (tỷ lệ 1:1 về thể tích, pha trong PBS 1X) lên bề mặt điện cực làm việc đã được biến tính SAM để hoạt hóa các nhóm carboxyl. Bước này thúc đẩy sự hình thành liên kết amide với các nhóm amin của kháng thể, làm tăng hiệu quả và tính đặc hiệu của quá trình gắn kết. Điện cực được giữ trong dung dịch EDC/NHS 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa sạch để loại bỏ thuốc thử dư. Tiếp theo, nhỏ 3,0 μL dung dịch kháng thể anti-BSA

(nồng độ 15 μM , pha trong PBS 1X) lên bề mặt điện cực làm việc và giữ trong 2 giờ ở 4 °C. Bước này cho phép hình thành liên kết cộng hóa trị amide giữa SAM đã hoạt hóa và các nhóm amin của kháng thể. Sau đó, điện cực được rửa để loại bỏ kháng thể không gắn kết và bảo quản ở 4 °C cho bước phát hiện BSA-FITC sau đó.

- Bước 3: Bắt giữ kháng nguyên.

Để tạo điều kiện thúc đẩy tương tác kháng nguyên–kháng thể, 3,0 μL dung dịch protein BSA-FITC pha trong PBS 1X với các nồng độ khác nhau được nhỏ lên bề mặt điện cực làm việc và giữ trong 1 giờ ở 4 °C để cho phép sự gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể anti-BSA đã cố định và protein BSA-FITC. Sau khi ủ, điện cực được rửa sạch để loại bỏ các protein không gắn kết đặc hiệu trước khi tiến hành khảo sát hình thái bề mặt và đặc tính điện hoá.

Các phép đo được thực hiện với 5 nồng độ BSA-FITC khác nhau, lần lượt là 0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,0 μM ; 4,0 μM ; 8,0 μM .

- Bước 4: Đánh giá hình thái bề mặt điện cực trần và phân tích huỳnh quang để xác nhận sự gắn kết protein.

Ảnh huỳnh quang được quan sát và chụp lại để xác nhận sự hiện diện của BSA-FITC trên điện cực đã biến tính. Sau bước 3, điện cực được đặt trên kính hiển vi huỳnh quang để quan sát định tính sự gắn kết protein và chụp, lưu các ảnh. Để định lượng, tín hiệu huỳnh quang được phân tích bằng phần mềm ImageJ bằng cách chọn một vùng ROI (region of interest) hình chữ nhật cố định trên mỗi ảnh và sử dụng chức năng Measure để xuất giá trị xám trung bình Mean [119]. Để khảo sát thêm về hình thái bề mặt và thành phần nguyên tố, các phép đo SEM và EDX cũng được thực hiện.

- Bước 5: Khảo sát đặc tính điện hoá.

Đặc tính điện hóa của điện cực SPAuE sau mỗi bước biến tính được khảo sát. Nhỏ 35 μL dung dịch điện ly bao phủ bề mặt của hệ 3 điện cực. Phép đo CV được thực hiện ở tốc độ quét 50 mV/s trong khoảng thế -0,2 đến 0,6 V. Phép đo SWV

được thực hiện trong khoảng thế $-0,4$ đến $0,8$ V. Cường độ dòng đỉnh và thế đỉnh được trích xuất tự động bằng phần mềm PS Trace 5.9 để đảm bảo tính nhất quán và chính xác. Phổ tổng trở điện hóa EIS được đo trong khoảng 10^5 Hz đến $0,05$ Hz với biên độ AC là 10 mV. Đồ thị Nyquist của phổ EIS được khớp với mạch tương đương Randles bằng phần mềm PS Trace 5.9 để tính điện trở truyền điện tích R_{CT} .

3.2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực cacbon phát hiện protein VP28

Ngoài việc sử dụng VP28 làm chỉ dấu sinh học có độ tin cậy cao để xác định sự hiện diện của WSSV, các nghiên cứu trước cũng cho thấy cảm biến sinh học điện hoá có khả năng phản ánh các biến đổi trên bề mặt điện cực thông qua tín hiệu dòng điện và sự thay đổi tính dẫn điện của môi trường giữa các điện cực. Trong số các kỹ thuật được áp dụng, CV và EIS đã được sử dụng rộng rãi nhờ tính đơn giản, khả năng lặp lại và giới hạn phát hiện thấp, đặc biệt hiệu quả đối với các cảm biến ái lực. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu trước đó thường dựa vào cơ chế bắt cặp “bánh kẹp” miễn dịch hoặc quy trình tối ưu hoá nhiều bước để tăng cường độ nhạy của điện cực.

Dựa trên kết quả khả thi của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện BSA-FITC, luận án tiếp tục xây dựng quy trình chức năng hoá đơn giản và có tính lặp lại cao, cố định kháng thể anti-VP28. Các kỹ thuật CV và EIS được sử dụng nhằm phân tích định tính và định lượng sự thay đổi tín hiệu điện hoá của cảm biến trong quá trình biến tính điện cực và phát hiện protein VP28.

3.2.2.1. Hoá chất và thiết bị

a. Hoá chất

Cặp hoá chất chính bao gồm kháng thể anti-VP28 của hãng Abcam, United States và protein VP28 được tổng hợp từ phòng thí nghiệm. Liên kết đặc hiệu giữa cặp hoá chất kháng nguyên-kháng thể được xác nhận độc lập bằng phương pháp Western Blot. Kali ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), Kali ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) và Kali clorua (KCl), Gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4$), Sulfuric acid 98% (H_2SO_4), Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X, Bovine Serum Albumin (BSA) của

hãng Bio Basic, Canada. Các hoá chất còn lại tương tự với danh mục hoá chất đã cung cấp ở quy trình phát hiện protein BSA-FITC, mục 3.2.1.1.

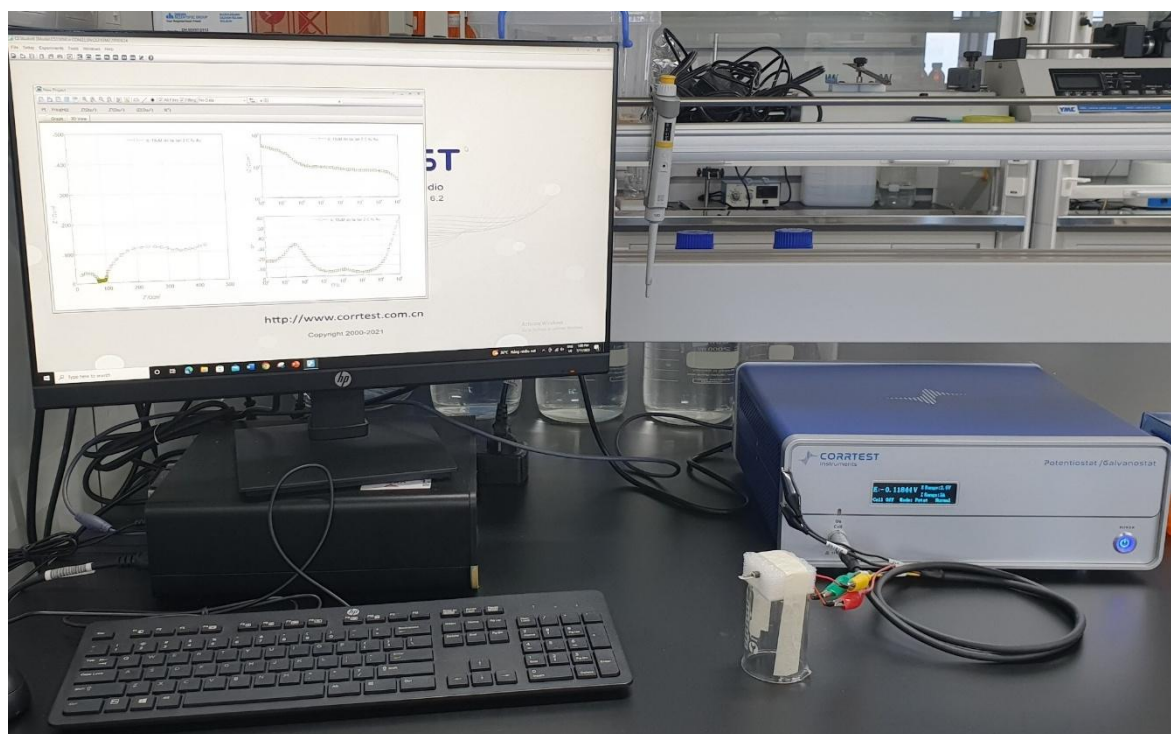
b. Điện cực

Điện cực cacbon SPCE (Screen-Printed Carbon Electrode) của hãng BioDevice Technology Ltd., Nhật Bản được sử dụng thực hiện quá trình chức năng hoá. Trước khi biến tính, các điện cực được rửa sạch bằng nước cất hai lần và làm khô nhẹ bằng khí nitơ, bước rửa và sấy khô này được áp dụng thống nhất trong tất cả các bước chức năng hóa và phát hiện VP28 của quy trình.

c. Thiết bị

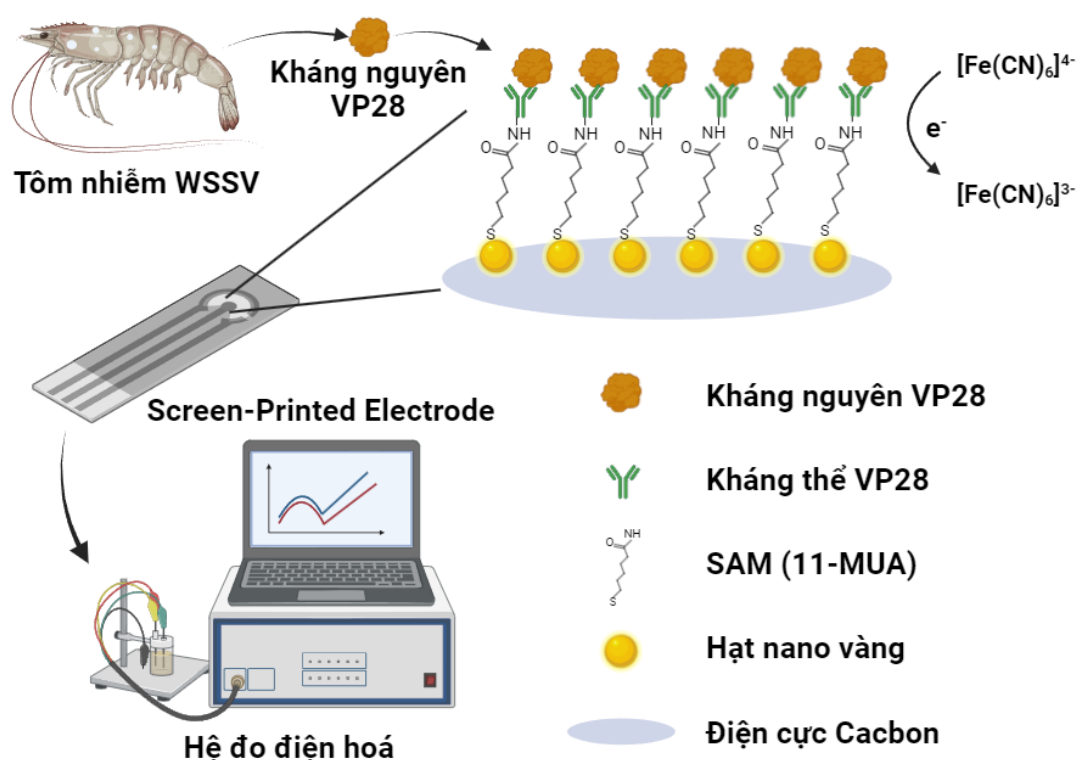
Tất cả các phép đo điện hóa được thực hiện ở nhiệt độ phòng, sử dụng hệ đo CS350M EIS Potentiostat/Galvanostat (Corrtest Instruments, Trung Quốc).

Hình 3.4 mô tả kết nối thiết bị đo CS350M EIS Potentiostat/Galvanostat với điện cực SPCE và phần mềm CS Studio 6 trên máy tính.



Hình 3.4. Kết nối thiết bị đo CS350M EIS Potentiostat/Galvanostat với điện cực SPCE và phần mềm CS Studio 6 trên máy tính.

3.2.2.2. Quy trình biến tính phủ các hạt nano vàng và chức năng hoá điện cực



Hình 3.5. Sơ đồ quy trình đề xuất chức năng hoá cảm biến phát hiện VP28 và kết nối cảm biến với hệ đo điện hóa.

Quy trình biến tính bề mặt điện cực để phát hiện VP28 và kết nối SPCE với hệ thống đo điện hóa được mô tả trong Hình 3.5. Quy trình gồm 5 bước như sau:

- Bước 1: Phủ các hạt nano vàng (AuNPs).

Bước đầu tiên của quy trình là phủ các hạt nano vàng (AuNPs) lên bề mặt điện cực bằng phương pháp quét CV. Chuẩn bị dung dịch HAuCl_4 nồng độ $165 \mu\text{M}$ pha trong đệm PBS 100 mM . Nhỏ $35 \mu\text{L}$ dung dịch này phủ kín bề mặt hệ ba điện cực của SPCE. Quá trình điện phân được thực hiện bằng cách quét 20 vòng CV trong dải thế từ $-0,6 \text{ V}$ đến $+0,5 \text{ V}$ với tốc độ 50 mV/s .

Sau khi phủ, điện cực được rửa sạch. Quá trình mạ AuNPs được hoàn thiện bằng cách quét 7 vòng CV trong dải thế từ $-0,2 \text{ V}$ đến $+1,4 \text{ V}$ với cùng tốc độ quét, trong $35 \mu\text{L}$ dung dịch H_2SO_4 1 M . Sau đó, điện cực được rửa sạch và ký hiệu là CE/AuNPs.

- Bước 2: Hình thành và hoạt hoá SAM MUA.

Ở bước thứ hai, điện cực CE/AuNPs được ủ qua đêm trong dung dịch MUA 5 mM pha trong ethanol để hình thành lớp đơn tự sắp xếp (SAM) trên bề mặt vàng thông qua liên kết Au-S giữa nhóm thiol (-SH) của MUA và các hạt nano vàng (AuNPs). Làm sạch điện cực, sau đó nhỏ 2,7 μ L hỗn hợp EDC/NHS (0,4 M/0,2 M) pha trong dung dịch PBS 1X lên bề mặt điện cực làm việc và ủ trong 30 phút để hoạt hóa các nhóm carboxyl (-COOH) trên SAM, tạo điều kiện cho liên kết cộng hoá trị với kháng thể ở bước tiếp theo. Điện cực sau bước này được làm sạch và ký hiệu là CE/AuNPs/activeMUA.

- Bước 3: Cố định kháng thể anti-VP28.

Ở bước thứ ba, nhỏ 2,7 μ L dung dịch kháng thể anti-VP28 có nồng độ 150 μ g/mL, pha trong dung dịch PBS 1X, lên bề mặt điện cực làm việc của CE/AuNPs/activeMUA và ủ trong 2 giờ ở 4 °C. Sau đó, điện cực được rửa sạch và ký hiệu là CE/AuNPs/activeMUA/anti-VP28. Tiếp theo, nhỏ 2,7 μ L dung dịch BSA 1% (pha trong PBS 1X) lên bề mặt điện cực làm việc và ủ trong 1 giờ ở 4 °C nhằm chặn các vị trí liên kết không đặc hiệu. Sau khi rửa sạch, điện cực được ký hiệu là CE/AuNPs/activeMUA/BSA/anti-VP28 và được bảo quản ở 4 °C cho bước phát hiện protein VP28. Trong điều kiện bảo quản ở 4 °C, các điện cực sau khi biến tính có thể được lưu giữ trong khoảng 2 tuần mà vẫn duy trì hoạt tính sinh học của lớp kháng thể.

- Bước 4: Bắt giữ protein VP28.

Protein VP28 được pha loãng trong dung dịch PBS 1X (pH 7,4) với các nồng độ khác nhau. Tiếp đến, nhỏ 2,7 μ L dung dịch protein VP28 lên bề mặt điện cực làm việc của CE/AuNPs/activeMUA/BSA/anti-VP28 và ủ trong 1 giờ nhằm thúc đẩy tương tác đặc hiệu. Sau đó, điện cực được làm sạch để loại bỏ các protein không gắn kết đặc hiệu trước khi tiến hành khảo sát đặc tính điện hoá.

Các phép đo được thực hiện tại 6 mức nồng độ VP28 khác nhau, lần lượt là 10 ng/mL; 20 ng/mL; 30 ng/mL; 40 ng/mL; 50 ng/mL và 60 ng/mL. Tại mỗi mức

nồng độ, tín hiệu được đo lặp lại 3 lần, và thí nghiệm được thực hiện trên 3 điện cực độc lập theo cùng một quy trình, tương ứng với kích thước mẫu $n = 3$ cho mỗi nồng độ.

- Bước 5: Khảo sát đặc tính điện hoá.

Thao tác bước này hoàn toàn tương tự với bước 5 đã cung cấp ở quy trình phát hiện protein BSA-FITC, mục 3.2.1.2. Cường độ dòng đỉnh và thế đỉnh được trích xuất tự động bằng phần mềm CS Studio 6. Phổ tổng trở điện hóa EIS được đo trong khoảng 0,01 Hz đến 10^5 Hz với biên độ AC là 10 mV. Đồ thị Nyquist của phổ EIS được khớp với mạch tương đương Randles bằng phần mềm CS Studio 6 để tính điện trở truyền điện tích R_{CT} .

3.3. Thiết kế hệ thống đo điện hoá di động không dây WPEMS phát hiện bệnh tôm đốm trắng do vi-rút WSSV

Hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS (Wireless Portable Electrochemical Measurement System) được thiết kế để phát hiện VP28 – protein quan trọng liên quan đến vi-rút hội chứng đốm trắng WSSV, gây ảnh hưởng tiêu cực đáng kể đến ngành nuôi tôm trên toàn thế giới. Hệ thống bao gồm cảm biến miễn dịch trên nền điện cực vàng SPAuE, thiết bị đo điện hoá tích hợp và giao diện người dùng tương thích với máy tính Windows và thiết bị Android.

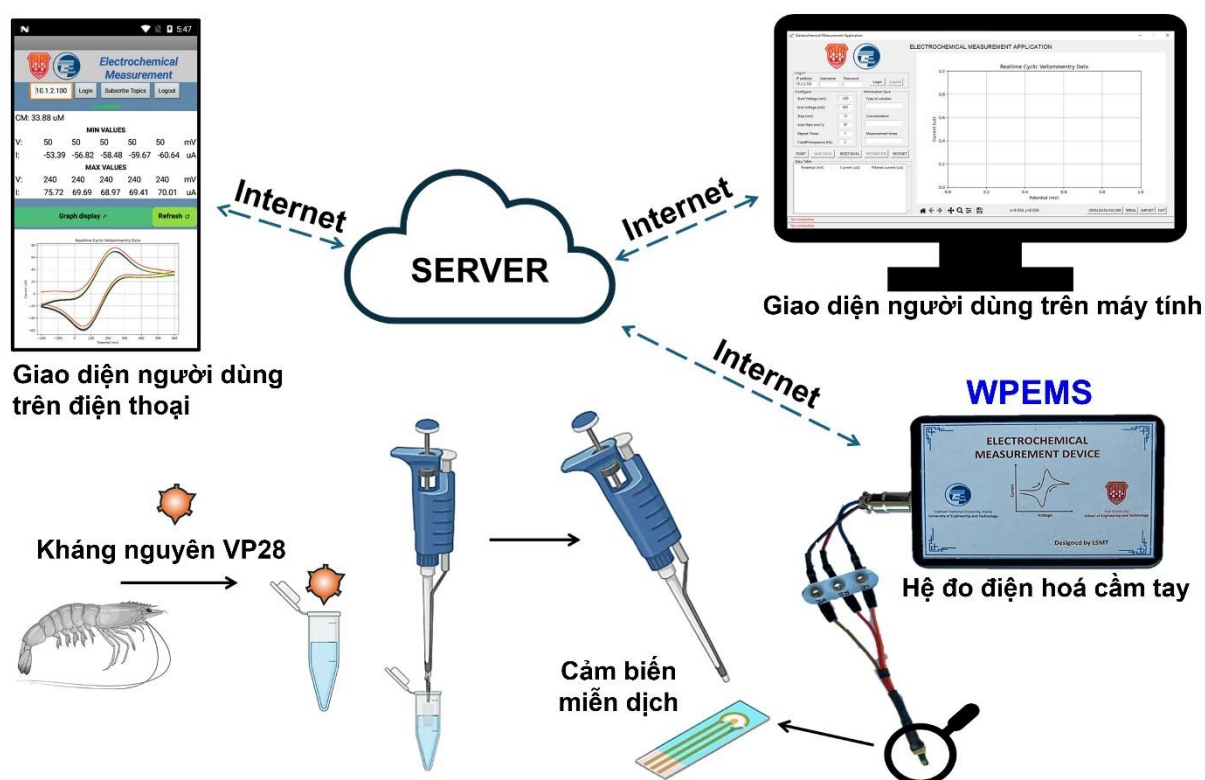
3.3.1. Mô tả hệ thống đo điện hóa di động không dây WPEMS

Các ứng dụng điện thoại thông minh kết hợp với cảm biến điện hóa cho phép phân tích dữ liệu theo thời gian thực, giám sát từ xa và chia sẻ dữ liệu để chẩn đoán chăm sóc và giám sát môi trường [101]. Hệ thống cảm biến sinh học điện hóa tích hợp cảm biến sinh học và bộ chuyển đổi tín hiệu điện hóa thiết lập trong luận án này gồm 3 phần chính [102]:

- (i) Phần tử nhận dạng sinh học phát hiện mục tiêu cần nhận dạng cụ thể: điện cực được chức năng hoá kháng thể anti-VP28, cho phép bắt giữ protein VP28.

- (ii) Hệ đo chuyển đổi tín hiệu sinh học thành tín hiệu điện có thể đo được: mạch đo điện hóa Potentiostat sử dụng module LMP91000.

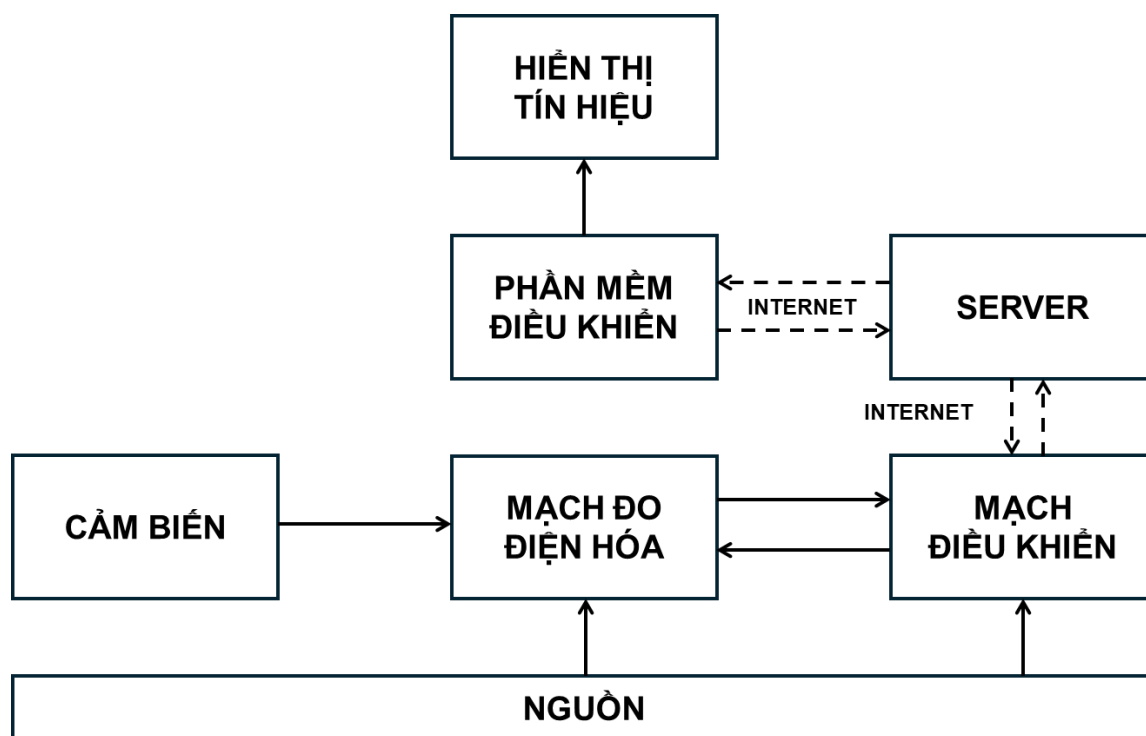
- (iii) Hệ thống xử lý tín hiệu chuyển đổi tín hiệu đo được thành tín hiệu có thể đọc được và hiển thị dữ liệu, tính toán các thông tin cần: Mạch điều khiển sử dụng ESP32 và phần mềm điều khiển được viết bằng ngôn ngữ Python được sử dụng cho mục đích xử lý tín hiệu và ứng dụng hiển thị.



Hình 3.6. Hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS tích hợp cảm biến phát hiện VP28.

Để cho phép giao tiếp không dây, hệ thống sử dụng giao thức truyền thông MQTT, tích hợp một máy chủ (Broker) để truyền, nhận các chủ đề (topics) và thông điệp (messages). Các topics và messages được xuất bản (published) và đăng ký (subscribed) bởi các Clients, bao gồm Phần mềm Điều khiển, Mạch điều khiển và Ứng dụng hiển thị. Ứng dụng hiển thị cài đặt trên điện thoại giúp người dùng giám sát và theo dõi từ xa được xây dựng trên MIT App Inventor. Bên cạnh giao tiếp không dây, hệ thống hỗ trợ kết nối có dây qua giao tiếp UART như một kênh truyền

dự phòng, phục vụ cấu hình, kiểm thử và vận hành ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm. Hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS tích hợp cảm biến phát hiện VP28 được thể hiện tổng quát trên Hình 3.6.



Hình 3.7. Sơ đồ khối hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS tích hợp cảm biến phát hiện VP28.

Sơ đồ khối của hệ thống đo lường điện hóa được thể hiện trên Hình 3.7. Hệ thống thu thập dữ liệu để chuyển đổi các tín hiệu đo được thành tín hiệu có thể đọc được và xuất ra thông tin cần thiết. Hệ thống bao gồm Mạch điều khiển, Phần mềm điều khiển được lập trình bằng ngôn ngữ lập trình Python cho xử lý tín hiệu và hiển thị trên máy tính chạy hệ điều hành Windows, điện thoại thông minh chạy hệ điều hành Android.

3.3.2. Chuẩn bị điện cực chức năng và mẫu đo

3.3.2.1. Chuẩn bị điện cực chức năng

a. Hoá chất

Protein VP28 của hãng Bioclone Inc (Hoa Kỳ). Các hoá chất còn lại tương tự với danh mục hoá chất đã cung cấp ở quy trình phát hiện protein VP28, mục 3.2.2.1.

b. Điện cực chức năng

Quy trình chức năng hoá cố định kháng thể anti-VP28 trên điện cực SPAuE được thực hiện từ bước 2 đến bước 3 trong quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện VP28 được cung cấp ở mục 3.2.2.2. Kháng thể anti-VP28 trong thí nghiệm này được pha loãng 10 lần trong PBS 1X.

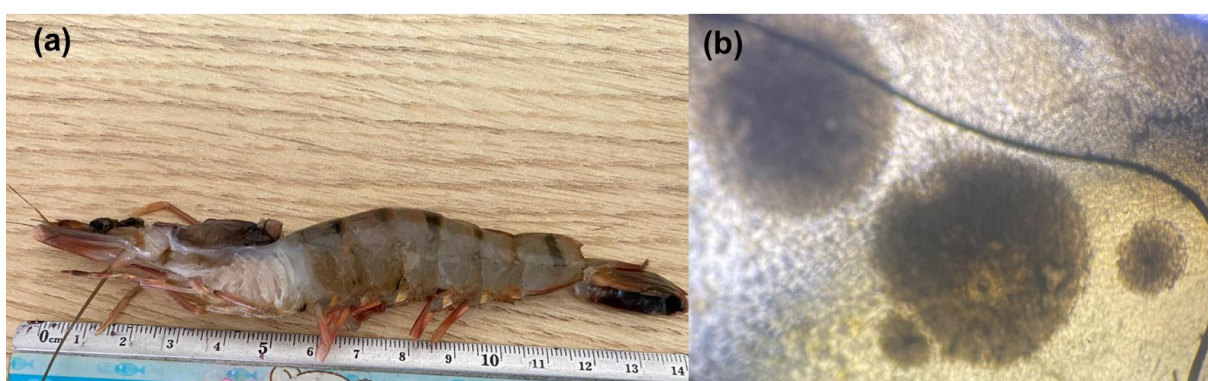
3.3.2.2. Chuẩn bị mẫu

a. Mẫu VP28

VP28 pha loãng ở các nồng độ khác nhau trong dải từ 5 đến 25 ng/mL trong PBS 1X. Thí nghiệm với VP28 theo bước 4 trong quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện VP28 được cung cấp ở mục 3.2.2.2.

b. Mẫu tôm nhiễm WSSV

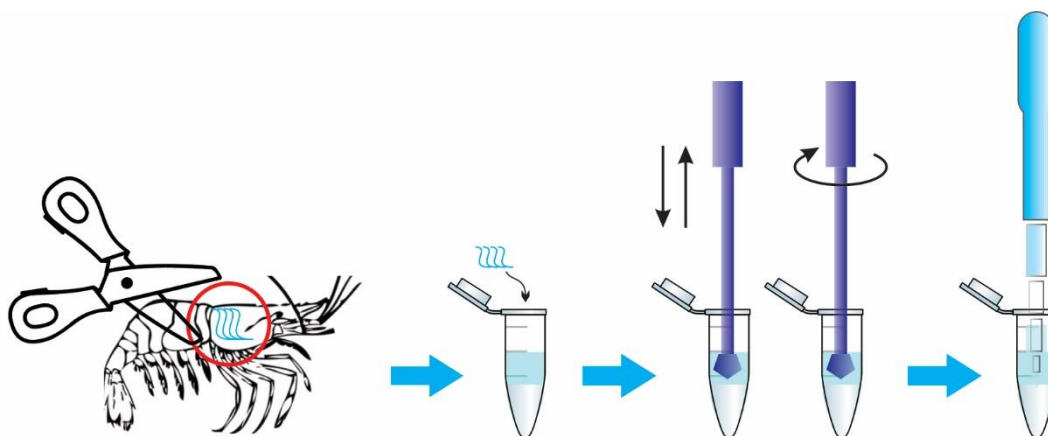
Mẫu tôm được xét nghiệm PCR cho thấy dương tính với WSSV được lấy từ Trạm chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật – Chi cục chăn nuôi và thú y Huế, của hộ nuôi tôm tại Quảng Phước, Quảng Điền. Mẫu tôm có chiều dài 14-15 cm, trọng lượng 15,94-15,96 g. Vỏ đầu tôm xuất hiện các đốm trắng có thể quan sát được bằng mắt thường. Mẫu tôm và các đốm trắng được quan sát dưới kính hiển vi mô tả trên Hình 3.8.



Hình 3.8. (a) Mẫu tôm sú dương tính với WSSV với chiều dài 14-15 cm, trọng lượng 15,94-15,96g; (b) Vỏ đầu tôm với các đốm được quan sát dưới kính hiển vi.

Tôm được rửa sạch bằng nước cất, sau đó 2 mẫu mang tôm được lấy và cho vào eppendorf chứa 250 μ l dung dịch PBS 1X. Tiếp đến, dùng chày sử dụng một

lần, đầm và xoáy mẫu trong 20 lần. Dung dịch mẫu tôm sau đó được ly tâm ở 6000 rpm trong 8 phút nhằm loại bỏ các tạp chất không hòa tan và thu được dịch nổi có độ đồng nhất cao. Sau quá trình ly tâm, 200 μ L dịch nổi được thu và bảo quản ở 4 °C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Quy trình này góp phần giảm thiểu ảnh hưởng của nền mẫu và hạn chế hiện tượng bám bẩn bề mặt điện cực trong các bước đo điện hóa tiếp theo. Quy trình chuẩn bị mẫu tôm được mô tả trên Hình 3.9.



Hình 3.9. Quy trình chuẩn bị mẫu tôm WSSV cho thí nghiệm [13].

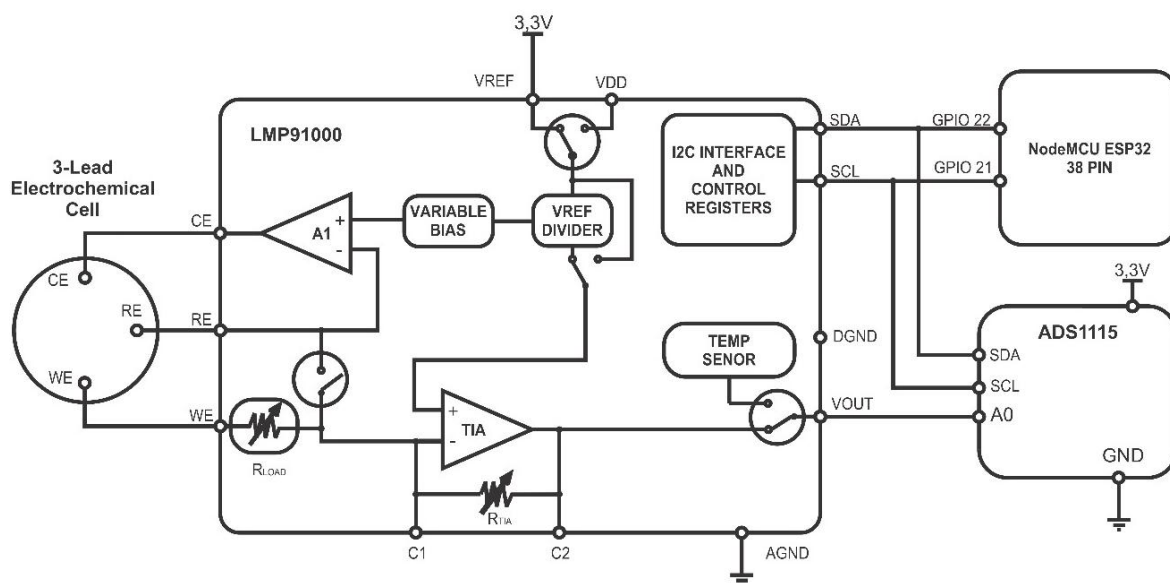
Mẫu đối chứng dương là mẫu dung dịch protein VP28 tinh khiết, nồng độ 50 ng/mL pha trong dung dịch PBS 1X. Mẫu đối chứng âm là mẫu trắng.

Nhỏ 3 μ L dung dịch mẫu tôm WSSV lên bề mặt điện cực làm việc SPAuE và ủ trong 1 giờ ở 4 °C. Sau thời gian ủ, bề mặt điện cực được làm sạch 5 lần bằng nước cất và để khô tự nhiên trước khi tiến hành đo điện hóa. Thí nghiệm được đo lặp lại 3 lần.

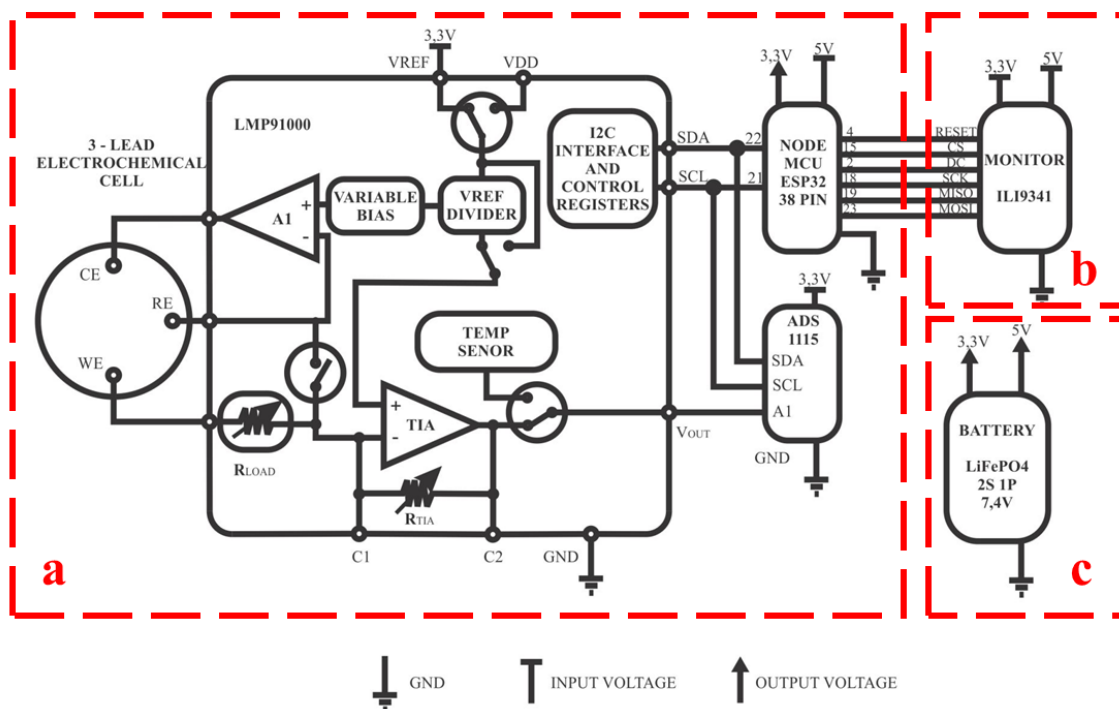
3.3.3. Thiết kế phần cứng

3.3.3.1. Sơ đồ nguyên lý

Hình 3.10 minh họa sơ đồ nguyên lý của Mạch điều khiển. LMP91000 hoạt động như khối giao tiếp với hệ điện hoá ba điện cực. LMP91000 nhận tín hiệu điều khiển từ ESP32 thông qua giao thức I²C. LMP91000 thiết lập và duy trì điện thế giữa điện cực làm việc (WE) và điện cực so sánh (RE) bằng cách điều khiển điện cực đối (CE).



Hình 3.10. Sơ đồ nguyên lý Mạch điều khiển.



Hình 3.11. Sơ đồ nguyên lý Mạch điều khiển tích hợp màn hình LCD và nguồn pin:
(a) Mạch điều khiển; (b) Màn hình LCD; (c) Pin.

Tín hiệu dòng điện sinh ra tại điện cực làm việc được chuyển đổi thành điện áp nhờ bộ khuếch đại chuyển đổi dòng–điện áp (TIA) bên trong LMP91000. LMP91000 xuất tín hiệu điện áp tại V_{out} . Tín hiệu V_{out} này được kết nối với ADC

16-bit của mạch ADS1115, và sau đó tín hiệu chuyển đổi được truyền trở lại ESP32 thông qua giao tiếp I²C.

Thiết kế ban đầu mô tả trên Hình 3.10 phục vụ mục đích thử nghiệm và kiểm chứng chức năng đo điện hoá, thiết lập các thực nghiệm tại phòng thí nghiệm. Sơ đồ mạch cải tiến Hình 3.11 được mở rộng về mức độ tích hợp và tính hoàn thiện hệ thống, hướng tới việc xây dựng một mạch điều khiển đầy đủ, ổn định và phù hợp cho triển khai ứng dụng thực địa. Các cải tiến tập trung vào việc tích hợp đồng bộ các khối điều khiển, đo lường, cấp nguồn và hiển thị, nhằm nâng cao độ tin cậy, tính linh hoạt và khả năng vận hành độc lập của hệ đo điện hoá.

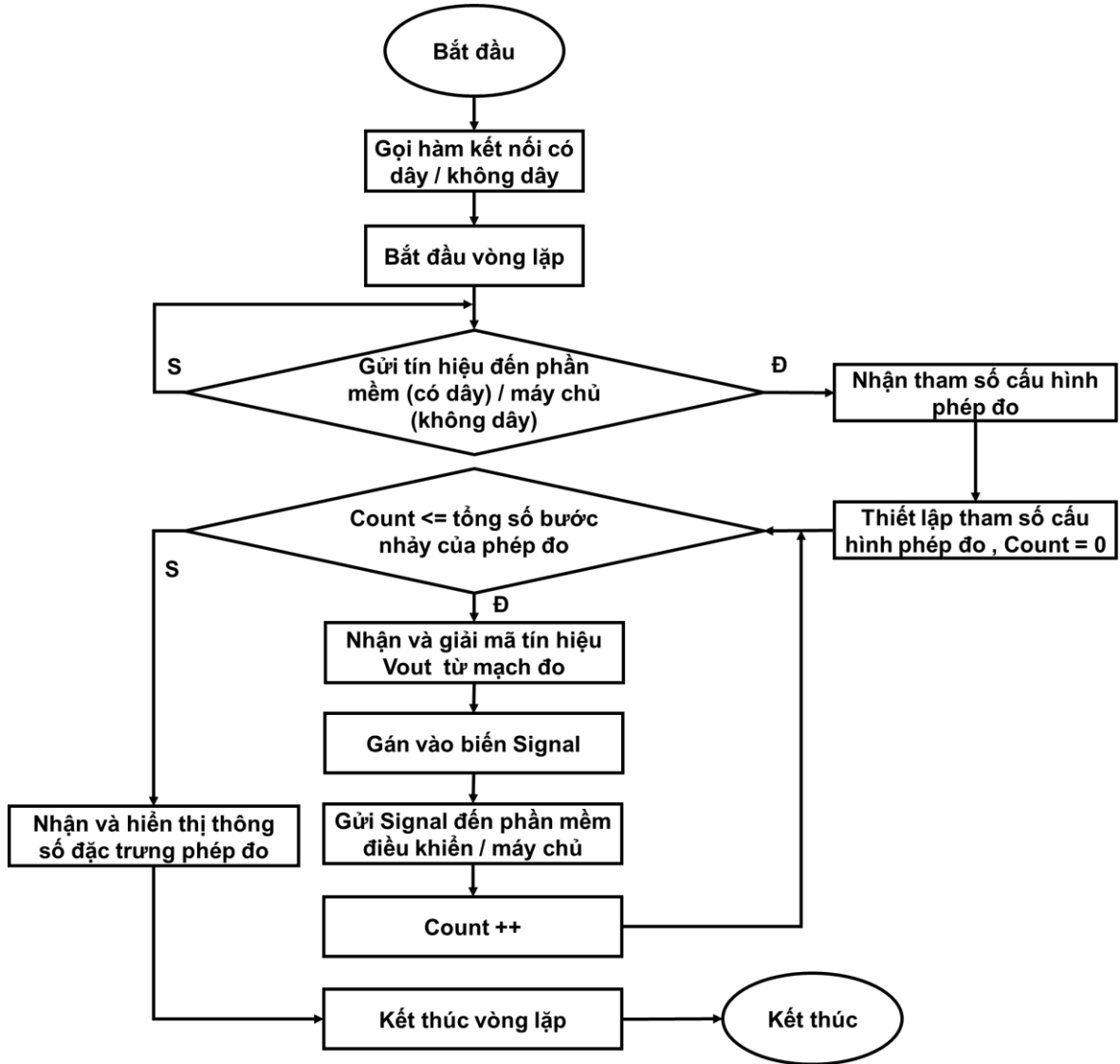
3.3.3.2. Giải thuật điều khiển

Giải thuật điều khiển tổng thể của Mạch điều khiển quá trình đo điện hoá, áp dụng cho cả chế độ kết nối có dây và không dây, được xây dựng nhằm đảm bảo quá trình đo diễn ra liên tục, chính xác và ổn định. Sơ đồ giải thuật lập trình Mạch điều khiển được trình bày trên Hình 3.12, minh họa rõ các bước xử lý chính của Mạch điều khiển. Khi hệ thống khởi động, mạch điều khiển ESP32 thực hiện giai đoạn khởi tạo, bao gồm thiết lập các giao tiếp cần thiết; đồng thời, trong chế độ không dây, kết nối đến máy chủ thông qua giao thức MQTT với các tham số cấu hình như địa chỉ IP và cổng kết nối. Đây là bước tiền đề nhằm đảm bảo mạch điều khiển có thể giao tiếp ổn định với phần mềm điều khiển trên máy tính và ứng dụng hiển thị trên thiết bị di động.

Sau khi hoàn tất quá trình khởi tạo, chương trình chuyển sang vòng lặp chính đóng vai trò xử lý trung tâm của giải thuật điều khiển. Trong vòng lặp này, ESP32 liên tục kiểm tra trạng thái kết nối và chờ lệnh đo từ phần mềm điều khiển. Chỉ khi kết nối được xác nhận và lệnh đo hợp lệ được gửi xuống, hệ thống mới chuyển sang giai đoạn nhận và xử lý các tham số đo. Các tham số đo bao gồm điện áp bắt đầu quét *startV*, điện áp kết thúc *endV*, bước thế *Estep* và số chu kỳ quét *cycle*. Dựa trên các giá trị này, ESP32 tính toán tổng số điểm đo cần thu thập theo công thức:

$$n = \left(\frac{endV - startV}{step} + 1 \right) \times cycle \times 2 \quad (3.1)$$

trong đó hệ số 2 phản ánh hai chiều quét thuận và quét nghịch đặc trưng của phép đo CV.



Hình 3.12. Sơ đồ giải thuật lập trình Mạch điều khiển với kết nối không dây và có dây.

Sau khi hoàn tất bước thiết lập, giải thuật chuyển sang vòng lặp thực hiện phép đo CV. Tại mỗi lần lặp, ESP32 gửi lệnh điều chỉnh điện thế tương ứng đến mạch Potentiostat LMP91000, đồng thời đọc tín hiệu điện áp V_{out} thông qua bộ chuyển đổi tương tự-số ADS1115. Giá trị đo từ ADS1115 là dữ liệu số của điện áp

đầu ra V_{out} từ mạch khuếch đại dòng-thế, đại diện cho dòng điện điện hoá tại điện cực làm việc; dữ liệu này được ESP32 xử lý và chuẩn hoá thành gói dữ liệu gồm thể quét và giá trị dòng điện tương ứng.

Gói dữ liệu này sau đó được truyền về máy chủ hoặc phần mềm điều khiển để hiển thị theo thời gian thực. Biến đếm được tăng dần sau mỗi lần lấy mẫu, và quá trình này lặp lại cho đến khi toàn bộ số điểm đo n được thu thập đầy đủ. Khi phép đo hoàn tất, chương trình kết thúc vòng lặp đo, hiển thị các thông tin đặc trưng của phép đo lên màn hình LCD và quay trở lại trạng thái chờ lệnh mới.

Bảng 3.1. Giải thuật cho Mạch điều khiển với kết nối không dây.

Giải thuật 1. Mạch điều khiển (không dây).	
1.	Begin
2.	Call function connect to Server
3.	Start infinite loop
4.	If Server and Control Software are connected
5.	Receive parameters
6.	Set parameters
7.	Initialize count to 0
8.	While count $\leq n$
9.	Collect V_{out} signal
10.	Initialize signal as converted V_{out} signal
11.	Send signal to Server
12.	Increment count
13.	End While
14.	End infinite loop
15.	End

Giải thuật cụ thể cho Mạch điều khiển với kết nối không dây được mô tả trên Bảng 3.1. Ban đầu, khi khởi động chương trình, Mạch điều khiển được cấu hình để kết nối với Máy chủ (MQTT broker) với thông tin bao gồm địa chỉ IP và Port (2). Sau đó, chương trình liên tục kiểm tra trạng thái kết nối giữa Máy chủ và Phần mềm điều khiển trong một vòng lặp vô hạn (3). Nếu trạng thái trả về là kết nối thành công (4), chương trình nhận và thiết lập các tham số bao gồm điện áp khởi đầu

($startV$), điện áp kết thúc ($endV$), $E-step$ và số chu kỳ quét (5, 6) để thực hiện đo CV. Đồng thời, nó khởi tạo biến đếm $count$ về 0 (7). Tại điểm này, chương trình bắt đầu vòng lặp thực hiện đo CV. Với điều kiện là $count \leq n = ((endV - startV)/step + 1) * cycle * 2$ (8), ESP32 thu thập tín hiệu V_{out} từ LMP91000 thông qua ADS1115 sử dụng giao thức I²C (9, 10). Sau đó gửi tín hiệu đã chuyển đổi này đến Máy chủ (11) và tăng giá trị của biến đếm lên 1 (12). Khi $count > n$, vòng lặp kết thúc (13), hoàn thành quá trình đo lường. Tại giai đoạn này, chương trình quay lại kiểm tra trạng thái kết nối (4). Giải thuật tương tự cho Mạch điều khiển với kết nối có dây.

3.3.4. Thiết kế phần mềm

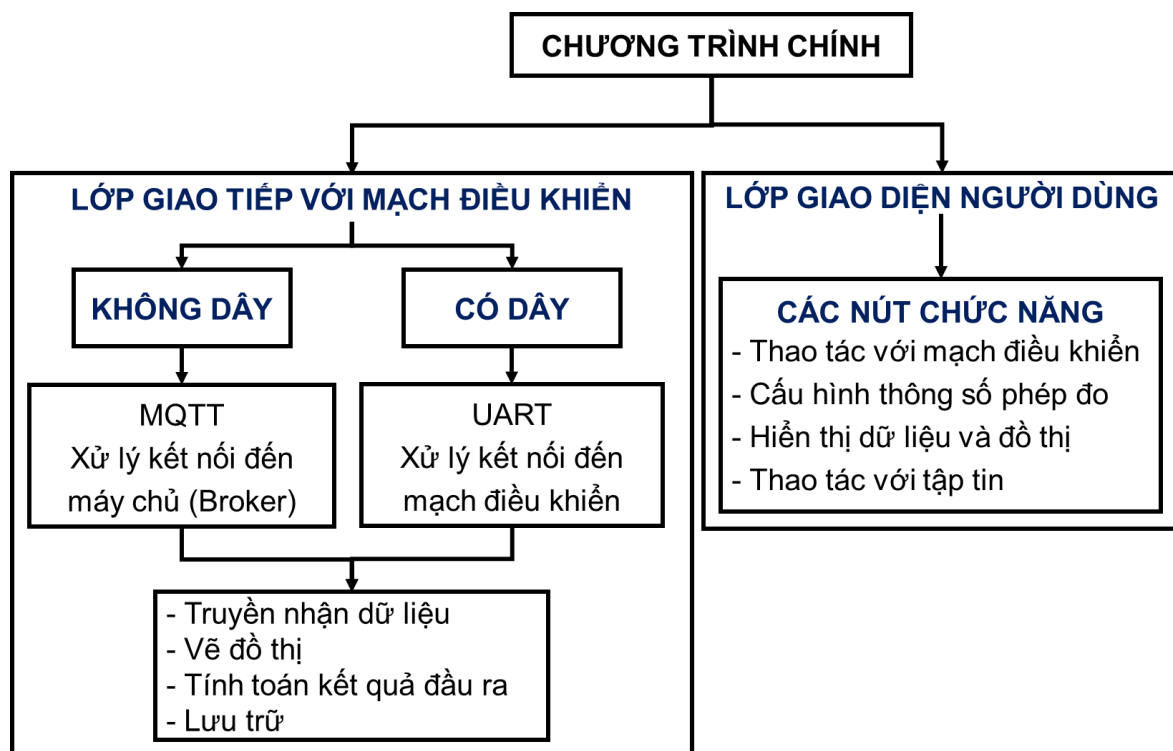
Phần mềm trong hệ đo điện hoá không chỉ thực hiện chức năng giao tiếp với phần cứng mà còn đảm nhiệm toàn bộ quá trình xử lý tín hiệu bao gồm thu nhận dữ liệu theo thời gian thực, lọc nhiễu, trích xuất các thông số đặc trưng và trực quan hoá tín hiệu dòng-thế. Đối với phép đo quét thể tuần hoàn, phần mềm cần đáp ứng các yêu cầu hiển thị tín hiệu với độ trễ thấp, cho phép cấu hình linh hoạt các tham số đo, hỗ trợ kết nối đa chế độ có dây và không dây, đồng thời đảm bảo giao diện thân thiện và dễ vận hành. Những yêu cầu này càng trở nên quan trọng khi tích hợp hệ đo điện hoá với nền tảng IoT phục vụ giám sát và phân tích từ xa.

3.3.4.1. Kiến trúc phần mềm điều khiển

Phần mềm điều khiển được xây dựng theo kiến trúc hai lớp nhằm tổ chức các chức năng một cách khoa học, đảm bảo hệ thống vừa dễ triển khai, dễ mở rộng, vừa đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của phép đo quét thể tuần hoàn theo thời gian thực. Việc phân tách rõ ràng giữa lớp giao tiếp với phần cứng và lớp giao diện người dùng giúp tăng tính linh hoạt trong phát triển, giảm độ phức tạp của mã nguồn và tối ưu hiệu suất vận hành của phần mềm. Kiến trúc này được minh họa trong Hình 3.13, thể hiện luồng xử lý từ thu nhận dữ liệu, xử lý tín hiệu đến hiển thị và tương tác với người sử dụng.

Lớp giao tiếp đóng vai trò là cầu nối trực tiếp giữa phần mềm và hệ đo điện hoá. Đây là lớp nền tảng chịu trách nhiệm thiết lập và duy trì sự ổn định của kênh

truyền dữ liệu giữa mạch điều khiển và phần mềm. Để hỗ trợ khả năng vận hành linh hoạt trong nhiều môi trường khác nhau, lớp giao tiếp được chia thành hai lớp con, tương ứng với hai cơ chế truyền thông chính mà hệ đo hỗ trợ. Thứ nhất, lớp giao tiếp có dây sử dụng chuẩn truyền thông UART (Serial), cho phép truyền nhận dữ liệu trực tiếp giữa ESP32 và máy tính với độ trễ rất thấp. Phương thức này đặc biệt phù hợp trong các thí nghiệm yêu cầu tín hiệu ổn định và băng thông cao, chẳng hạn khi thực hiện đo lặp nhiều chu kỳ quét trong thời gian ngắn. Thứ hai, lớp giao tiếp không dây sử dụng giao thức MQTT theo mô hình Client - Broker. MQTT là giao thức truyền thông nhẹ, hiệu quả và ổn định trong môi trường IoT, cho phép triển khai hệ đo từ xa mà không ảnh hưởng đến tốc độ truyền dữ liệu. Việc tích hợp đồng thời cả UART và MQTT giúp hệ đo vận hành linh hoạt, vừa hỗ trợ các thí nghiệm tại chỗ, vừa thích hợp cho các ứng dụng giám sát điện hoá qua mạng.



Hình 3.13. Kiến trúc phần mềm.

Bên cạnh nhiệm vụ truyền nhận dữ liệu, lớp giao tiếp còn đảm nhiệm quản lý kết nối và xử lý sai lỗi trong quá trình vận hành. Cụ thể, phần mềm thực hiện theo dõi trạng thái kết nối theo thời gian thực, phát hiện trường hợp mất tín hiệu và tự

động khởi tạo lại kết nối để đảm bảo quá trình đo không bị gián đoạn. Điều này đặc biệt quan trọng trong phép đo CV liên tục, nơi sự gián đoạn dữ liệu có thể ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của đồ thị và kết quả phân tích.

Ngay sau khi dữ liệu dòng-thế được truyền về từ lớp giao tiếp, quá trình xử lý tín hiệu được thực hiện theo một chuỗi thuật toán tiền xử lý. Các giá trị Potential và Current đầu tiên được tách khỏi chuỗi ký tự và chuyển đổi sang dạng số. Tiếp theo, dữ liệu thô được đưa vào bộ lọc thông thấp Butterworth nhằm loại bỏ nhiễu cao tần và làm mượt tín hiệu trước khi hiển thị. Đây là bước quan trọng giúp cải thiện chất lượng đồ thị CV, hỗ trợ người dùng trong việc nhận diện rõ ràng các đỉnh oxi hóa - khử và phân tích sự biến thiên của tín hiệu. Sau khi lọc, phần mềm tiếp tục trích xuất các thông số đặc trưng của tín hiệu, bao gồm giá trị dòng đỉnh cực đại I_{max} , dòng đỉnh cực tiểu I_{min} , độ tách thế đỉnh ΔE và nồng độ dung dịch đo C_M dựa trên mô hình hiệu chuẩn tích hợp. Các tham số này là cơ sở quan trọng cho các phép phân tích tiếp theo, đặc biệt khi hệ đo được sử dụng để đánh giá vật liệu hoặc phát triển cảm biến điện hoá.

Trong khi lớp giao tiếp đảm nhận phần xử lý tín hiệu và truyền thông, lớp giao diện người dùng đóng vai trò trực quan hóa toàn bộ hoạt động của hệ đo. Lớp này cung cấp môi trường tương tác trực tiếp với người sử dụng, nơi các tham số đo được cấu hình, tín hiệu CV được hiển thị và các chức năng quản lý dữ liệu được thực thi. Giao diện được thiết kế trực quan, bao gồm các nút chức năng như thao tác với mạch điều khiển (*Start, Pause, Restart*), cấu hình các tham số đo (*Start Voltage, End Voltage, Step, Scan Rate, Repeat Times*), hiển thị đồ thị CV theo thời gian thực và các tiện ích quản lý tệp dữ liệu như lưu trữ, tải lại dữ liệu hoặc xuất đồ thị.

Nhờ sự phân tách rõ ràng giữa hai lớp và cơ chế xử lý có tổ chức, phần mềm không chỉ đáp ứng yêu cầu đo CV theo thời gian thực mà còn cho phép mở rộng dễ dàng trong tương lai, chẳng hạn tích hợp thêm các kỹ thuật điện hoá khác, bổ sung thuật toán nâng cao hoặc hỗ trợ thêm các dạng phần cứng mới mà không làm ảnh hưởng đến cấu trúc tổng thể của hệ thống.

3.3.4.2. Xây dựng phần mềm điều khiển

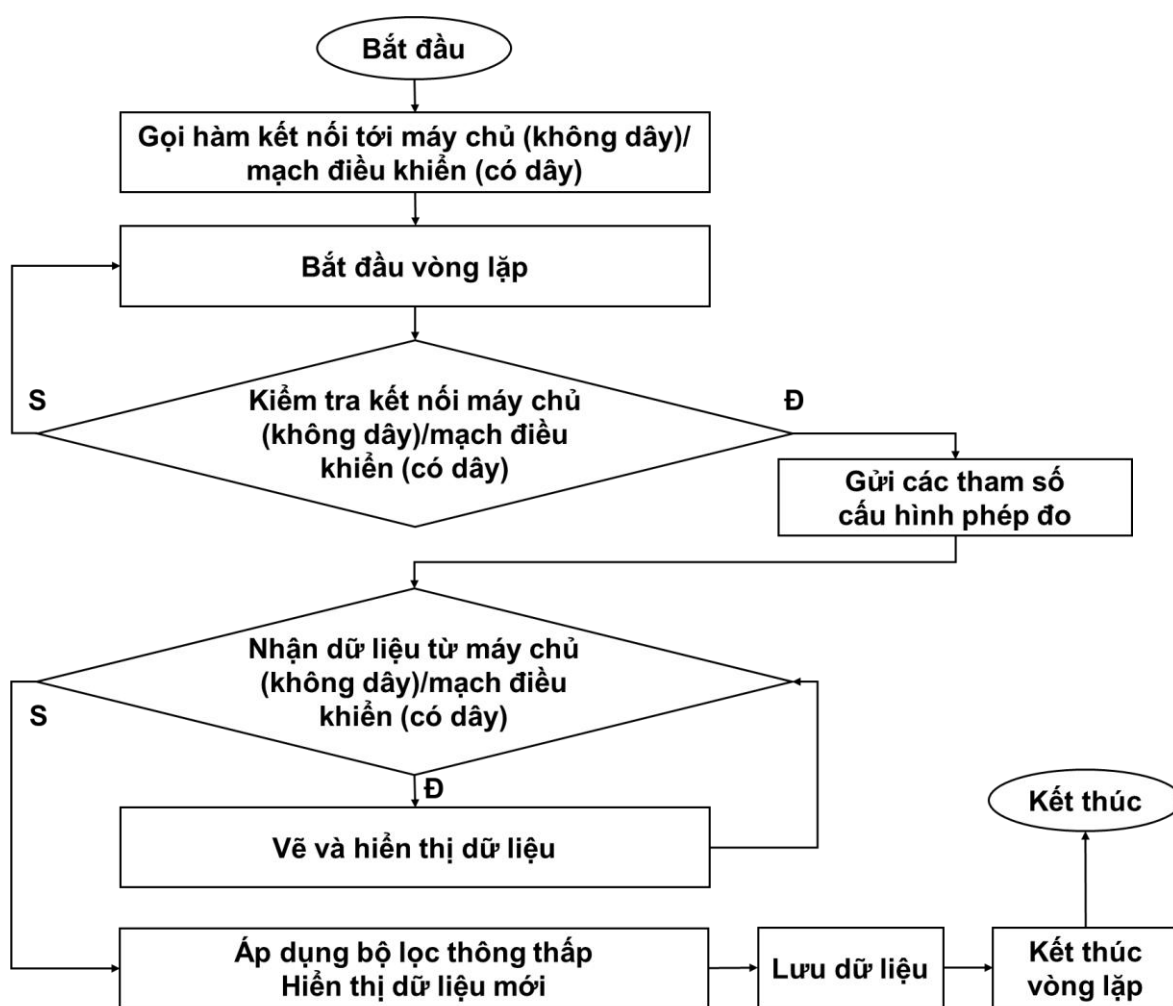
Phần mềm điều khiển được phát triển bằng ngôn ngữ lập trình Python, đóng vai trò là giao diện trung tâm phục vụ phép đo quét thể tuần hoàn (CV). Các nút chức năng trên giao diện được gán tương ứng với từng thao tác đo, cho phép thiết lập tham số, điều khiển quá trình đo và theo dõi kết quả. Phần mềm hỗ trợ vẽ đồ thị và hiển thị dữ liệu theo thời gian thực cho cả hai chế độ kết nối có dây và không dây, đồng thời cho phép nhập dữ liệu, trích xuất các thông số đặc trưng như giá trị dòng điện cực đại, dòng điện cực tiểu và thực hiện tính toán nồng độ mẫu đo. Toàn bộ mã nguồn, cùng hướng dẫn cài đặt và sử dụng phần mềm, được cung cấp trong Phụ lục 3.

Giải thuật điều khiển và xử lý dữ liệu của phần mềm giữ vai trò trung tâm trong toàn bộ hệ thống đo điện hoá thời gian thực, do đây là khối liên kết trực tiếp giữa phần cứng và người sử dụng, đồng thời bảo đảm luồng dữ liệu được truyền liên tục, chính xác và có thể xử lý tức thời. Hình 3.14 trình bày sơ đồ giải thuật mô tả quy trình hoạt động của phần mềm từ giai đoạn khởi tạo đến khi kết thúc một chu kỳ đo, làm rõ các bước điều khiển phép đo, thu nhận, xử lý và hiển thị dữ liệu. Sơ đồ này là cơ sở giúp phần mềm vận hành ổn định và cho phép người dùng tương tác với hệ đo một cách hiệu quả.

Bước đầu tiên của giải thuật là quá trình khởi tạo phần mềm, bao gồm mở các cổng giao tiếp, tải các thư viện xử lý dữ liệu cần thiết và thiết lập các tham số ban đầu. Ở giai đoạn này, phần mềm đồng thời khởi tạo các đối tượng quản lý giao thức truyền thông, bao gồm MQTT cho kết nối không dây và UART cho kết nối có dây. Việc hỗ trợ song song hai phương thức truyền thông giúp hệ thống linh hoạt khi vận hành trong nhiều điều kiện khác nhau, từ môi trường phòng thí nghiệm đến các hệ đo từ xa yêu cầu tính cơ động cao.

Sau khi hoàn tất khởi tạo, phần mềm thực hiện bước kết nối với máy chủ hoặc mạch điều khiển. Trong chế độ không dây, phần mềm gửi yêu cầu kết nối đến broker MQTT với các tham số cấu hình sẵn như địa chỉ IP, cổng giao tiếp và các

chủ đề dữ liệu cần đăng ký. Khi kết nối được thiết lập thành công, phần mềm đợi các thông điệp gửi từ mạch điều khiển. Trong chế độ có dây, phần mềm mở cổng UART và kiểm tra tín hiệu phản hồi từ mạch điều khiển; khi cổng giao tiếp sẵn sàng và có dữ liệu đến, phần mềm tiến hành nhận và phân tích gói tin. Việc hỗ trợ đồng thời hai phương thức kết nối giúp phần mềm thích ứng với nhiều cấu hình phần cứng và môi trường vận hành khác nhau.



Hình 3.14. Sơ đồ giải thuật điều khiển và xử lý dữ liệu của Phần mềm điều khiển.

Khi kết nối đã được xác nhận, phần mềm chuyển sang giai đoạn vận hành chính với một vòng lặp liên tục. Trong vòng lặp này, trước hết phần mềm kiểm tra trạng thái kết nối giữa máy tính và mạch điều khiển. Nếu kết nối bị gián đoạn, phần mềm tự động xử lý lỗi theo các cơ chế đã được lập trình trước, chẳng hạn như thử

kết nối lại sau một khoảng thời gian xác định hoặc thông báo lỗi cho người sử dụng. Khi kết nối ổn định, phần mềm gửi các tham số đo xuống mạch điều khiển, bao gồm thế khởi đầu, thế kết thúc, bước thế, tốc độ quét và số chu kỳ quét. Đây là các tham số cốt lõi quyết định dạng sóng quét thế tuần hoàn trong phép đo CV.

Ngay sau khi các tham số đo được gửi đi, phần mềm bắt đầu thu nhận dữ liệu thế và dòng điện được truyền từ thiết bị đo. Dữ liệu được gửi về dưới dạng chuỗi ký tự theo cấu trúc cố định nhằm bảo đảm tính thống nhất và thuận tiện cho quá trình xử lý. Chuỗi dữ liệu có dạng Potential;Current, trong đó dấu chấm phẩy được sử dụng làm ký tự phân tách. Phần mềm thực hiện tách chuỗi, chuyển đổi các giá trị từ dạng ký tự sang dạng số và lưu trữ tạm thời trong bộ đệm để phục vụ các bước hiển thị và xử lý tiếp theo.

Tiếp theo, phần mềm thực hiện vẽ đồ thị dòng–thế dựa trên các giá trị thu nhận được, cho phép người vận hành theo dõi trực quan quá trình quét thế theo thời gian thực. Các cặp giá trị thế và dòng điện được cập nhật liên tục lên đồ thị, đồng thời mỗi vòng quét có thể được hiển thị bằng màu sắc khác nhau nhằm phân biệt giữa các chu kỳ và quan sát sự biến đổi tín hiệu qua từng vòng quét.

Sau khi quá trình thu nhận dữ liệu kết thúc, phần mềm tiến hành xử lý tín hiệu bằng cách áp dụng bộ lọc thông thấp Butterworth để loại bỏ nhiễu tần số cao. Bộ lọc này được lựa chọn nhờ đặc tính đáp ứng mượt và không gây méo dạng tín hiệu, bảo đảm đường cong quét thế tuần hoàn sau lọc vẫn giữ được các đặc trưng điện hoá quan trọng. Dữ liệu sau đó được trích xuất các tham số đặc trưng, bao gồm dòng đỉnh cực đại, dòng đỉnh cực tiểu, độ tách thế đỉnh và nồng độ mẫu đo theo mô hình hiệu chuẩn đã được xây dựng. Các tham số này phản ánh động học phản ứng, khả năng trao đổi electron và các đặc tính bề mặt của điện cực trong quá trình phân tích điện hoá.

Giải thuật cụ thể cho Phần mềm điều khiển với kết nối không dây được mô tả trên Bảng 3.2. Đầu tiên, Phần mềm điều khiển gọi một hàm để kết nối với Máy chủ (MQTT broker) với các tham số bao gồm địa chỉ IP và Port (2). Sau đó, nó

kiểm tra trạng thái kết nối giữa Máy chủ và Mạch điều khiển trong một vòng lặp vô hạn (3). Nếu trạng thái trả về là kết nối (4), Phần mềm điều khiển gửi các tham số bao gồm điện áp khởi đầu, điện áp kết thúc, khoảng lấy mẫu và số chu kỳ (5) để thực hiện việc đo CV và đợi để nhận tín hiệu từ Máy chủ (6). Phần mềm điều khiển vẽ và hiển thị tín hiệu này lên giao diện đồ họa người dùng (GUI) (7). Sau khi hoàn thành việc đo CV (8), Phần mềm điều khiển áp dụng bộ lọc thông thấp (9, 10), và lưu dữ liệu, bao gồm tín hiệu gốc, tín hiệu đã lọc và các biểu đồ tương ứng (11). Ở giai đoạn này, chương trình trở lại kiểm tra trạng thái kết nối (4). Giải thuật tương tự cho Phần mềm điều khiển với kết nối có dây.

Bảng 3.2. Giải thuật cho Phần mềm điều khiển với kết nối không dây.

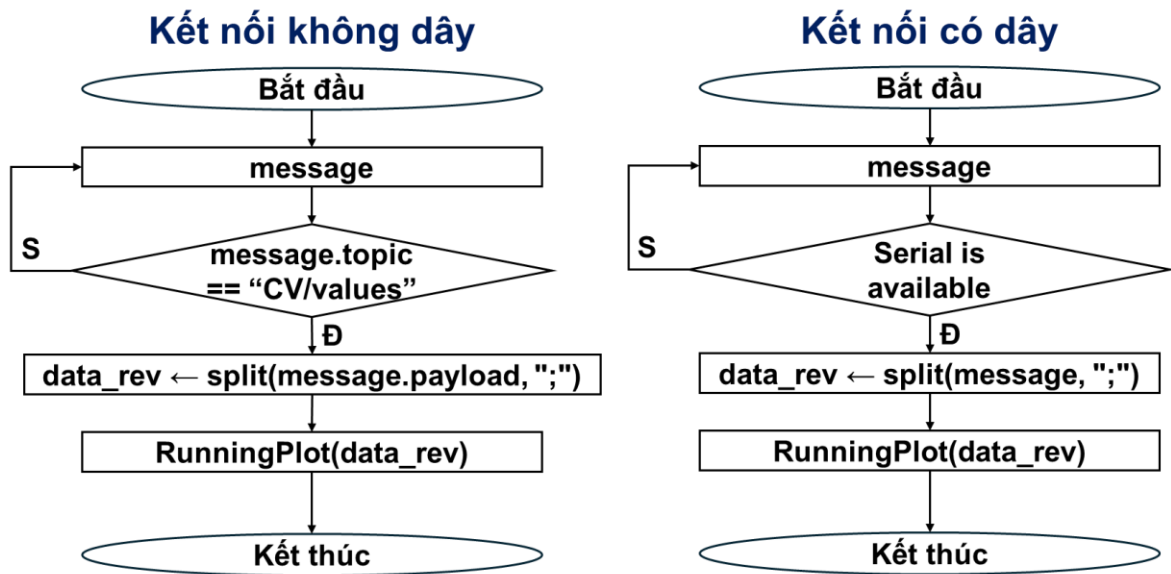
Thuật toán 2. Phần mềm điều khiển (không dây).	
1.	Begin
2.	Call function connect to Server
3.	Start infinite loop
4.	If Server and Control Circuit are connected
5.	Send parameters
6.	While Receive signal from Server
7.	Plot and Display signal
8.	End While
9.	Apply low-pass filter
10.	Plot and Display filtered signal
11.	Save data
12.	End infinite loop
13.	End

3.3.4.3. Xử lý chuỗi dữ liệu dòng-thể từ mạch điều khiển

Quá trình truyền nhận và tách chuỗi dữ liệu trong phần mềm điều khiển đóng vai trò then chốt trong hệ đo điện hoá thời gian thực, do đây là bước chuyển đổi dữ liệu thô từ mạch điều khiển sang định dạng có thể xử lý, phân tích và hiển thị. Hình 3.15 minh họa trình tự hoạt động của phần mềm trong hai chế độ truyền thông, bao gồm kết nối không dây thông qua giao thức MQTT và kết nối có dây qua giao tiếp UART. Mặc dù cơ chế truyền thông khác nhau, cả hai phương thức đều tuân theo

cùng một nguyên tắc xử lý dữ liệu, đó là tiếp nhận chuỗi ký tự chứa các giá trị thế và dòng điện, tách chuỗi thành các phần tử riêng biệt và chuyển đổi chúng sang dạng số để phục vụ thuật toán vẽ đồ thị và xử lý dữ liệu.

Trong chế độ kết nối không dây, phần mềm vận hành theo mô hình máy khách–máy chủ của giao thức MQTT. Dữ liệu đo được từ mạch điều khiển được đóng gói và truyền về phần mềm dưới dạng *payload* của thông điệp MQTT. Khi nhận được một thông điệp mới, thuật toán trước hết kiểm tra *topic* của thông điệp; nếu *topic* trùng với *CV Values*, phần mềm xác định đây là gói dữ liệu chứa các giá trị thế và dòng điện của phép đo CV. Nội dung *payload* được mã hoá dưới dạng chuỗi ký tự có cấu trúc, *Potential;Current*, trong đó dấu chấm phẩy đóng vai trò là ký tự phân tách. Để chuyển dữ liệu về dạng có thể xử lý, thuật toán thực hiện tách chuỗi *payload* tại các ký tự phân cách, thu được các giá trị riêng biệt, sau đó chuyển đổi chúng từ dạng ký tự sang dạng số. Các giá trị số này được sử dụng trực tiếp cho các bước hiển thị đồ thị và xử lý dữ liệu tiếp theo.



Hình 3.15. Nhận và tách chuỗi giá trị dòng-thế.

Sau khi quá trình tách chuỗi và chuyển đổi dữ liệu hoàn tất, các giá trị thu được được đưa vào hàm xử lý đồ thị *RunningPlot*, là hàm chịu trách nhiệm cập nhật đồ thị quét thế tuần hoàn theo thời gian thực. Thuật toán vẽ đồ thị sử dụng các cặp

giá trị thế–dòng điện để dựng đường cong đặc trưng của quá trình oxi hoá và khử xảy ra tại bề mặt điện cực. Nhờ cơ chế cập nhật liên tục và khả năng phân tách rõ ràng các chu kỳ quét, người vận hành có thể theo dõi trực tiếp sự biến đổi động học của phản ứng điện hoá, đồng thời phát hiện các dấu hiệu bất thường trong quá trình đo.

Trong chế độ kết nối có dây, dữ liệu được truyền thông qua giao tiếp UART, cho độ ổn định cao và độ trễ thấp. Phần mềm liên tục kiểm tra trạng thái sẵn sàng của cổng nối tiếp; khi có dữ liệu gửi đến, chuỗi ký tự được đọc trực tiếp từ mạch điều khiển. Mặc dù phương thức truyền thông khác với MQTT, cấu trúc dữ liệu nhận được vẫn giữ nguyên định dạng *Potential;Current*. Do đó, thuật toán tách chuỗi và chuyển đổi dữ liệu trong chế độ có dây hoàn toàn tương đồng với chế độ không dây. Sau khi chuyển đổi các giá trị sang dạng số, dữ liệu tiếp tục được chuyển đến hàm *RunningPlot* để cập nhật đồ thị dòng–thế theo thời gian thực.

Việc tách dữ liệu từ chuỗi ký tự đóng vai trò là bước trung gian quan trọng, cho phép chuyển đổi tín hiệu thô từ mạch điều khiển thành dữ liệu có cấu trúc để phục vụ xử lý và hiển thị. Nhờ đó, phần mềm có thể vẽ đồ thị quét thế tuần hoàn theo thời gian thực, cung cấp thông tin trực quan về các đặc tính điện hoá của hệ đo. Sự thống nhất trong thuật toán xử lý dữ liệu giữa hai cơ chế truyền thông, không dây và có dây, giúp phần mềm vận hành linh hoạt và ổn định trong nhiều điều kiện thí nghiệm cũng như các ứng dụng thực tế.

3.3.4.4. Triển khai bộ lọc thông thấp

Tín hiệu ban đầu nhận được từ mạch Điều khiển còn tồn tại nhiễu. Để loại bỏ nhiễu này, luận án xây dựng một hàm lọc thông thấp và truyền các thông số thích hợp cho bộ lọc này. Bộ lọc thông thấp được xây dựng từ các hàm trong thư viện *scipy.signal* trong Python. Đầu tiên, các tham số thích hợp được nhập vào hàm “*butter*”, bao gồm bậc của bộ lọc là 3, tần số lấy mẫu là 50 Hz (f_s) và tần số cắt là 2 Hz (f_c). Sau đó, các hệ số tử số (a) và mẫu số (b) của bộ lọc số học Butterworth được trả về bởi hàm “*butter*” [120].

$b, a = \text{signal.butter}(3, fc/(fs*0.5), \text{"low"})$

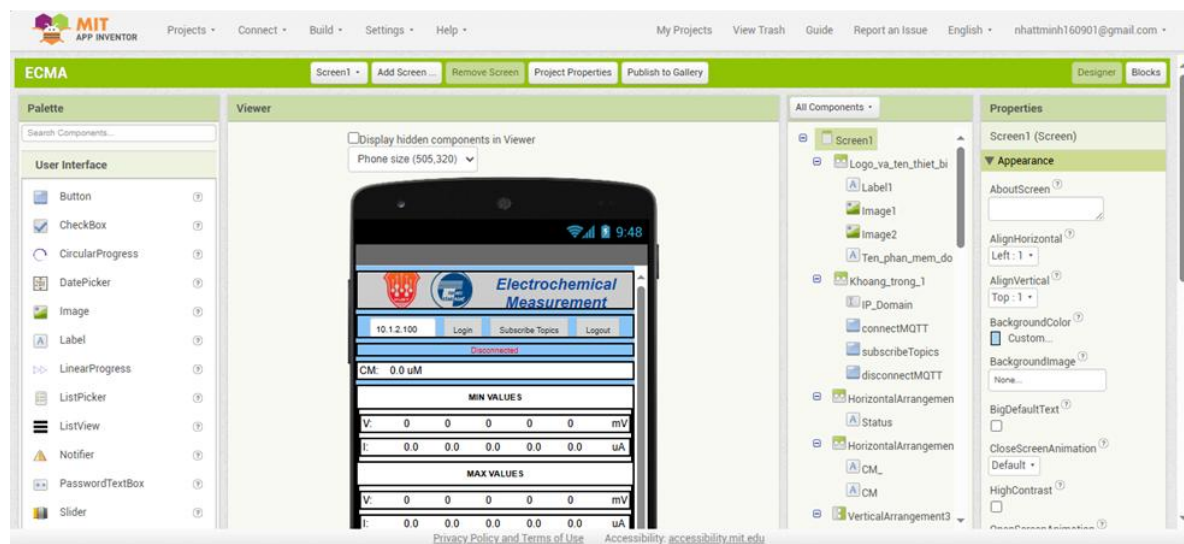
b và a là các hệ số đại diện cho các hệ số đa thức tử (b) và mẫu (a) của hàm chuyển đổi của bộ lọc. Hàm chuyển đổi mô tả mối quan hệ giữa tín hiệu đầu vào và đầu ra của bộ lọc.

Đối với bộ lọc Butterworth [121], b đại diện cho các hệ số của đa thức tử của bộ lọc, xác định vị trí của các điểm không của hàm chuyển đổi. Những điểm không này xác định vị trí của sự suy giảm hoặc tăng cường trong miền tần số. Hệ số a đại diện cho các hệ số của đa thức mẫu, xác định các điểm cực của hàm chuyển đổi. Những điểm cực này xác định phản ứng tần số của bộ lọc, bao gồm tính ổn định và hình dạng của đường cong suy giảm của nó.

Sau đó các hệ số được áp vào tín hiệu gốc (y) thông qua hàm “*filtfilt(b, a, y)*”. Hàm “*filtfilt*” trong *scipy.signal* thực hiện việc lọc tuyến tính là “*forward-backward filtering*”.

$\text{filtered_current} = \text{signal.filtfilt}(b, a, y)$

3.3.4.5. Xây dựng ứng dụng hiển thị người dùng



Hình 3.16. Xây dựng ứng dụng hiển thị trên điện thoại hệ điều hành Android.

Phần mềm điều khiển với kết nối không dây đã hỗ trợ việc thực hiện phép đo CV trở nên dễ dàng hơn. Tuy nhiên, chức năng hiển thị tín hiệu trên phần mềm điều

hiển vẫn đòi hỏi người dùng cần được đào tạo để hiểu cách thiết lập thông số và sử dụng các nút chức năng. Vì vậy, để đơn giản hóa nhất việc hiển thị thông tin từ phép đo CV, nghiên cứu này đề xuất thiết kế phần mềm dựa trên MIT App Inventor để hiển thị trên điện thoại thông minh hoạt động trên hệ điều hành Android (Hình 3.16). Ứng dụng sẽ hiển thị các dữ liệu cần thiết trong phép đo CV như biểu đồ, các giá trị nhỏ nhất, lớn nhất của dòng điện và giá trị nồng độ.

3.4. Đánh giá hệ thống

3.4.1. Đánh giá hiệu năng phần cứng

Việc đánh giá hiệu năng phần cứng tập trung vào hai nội dung chính:

- Khảo sát sự liên tục trong quá trình truyền và nhận tín hiệu và độ trễ giữa hai chế độ có dây/không dây.
- So sánh mức độ tương đương tín hiệu CV giữa hai chế độ có dây/không dây.
- Khảo sát độ lặp lại, đặc tính điện hoá qua hiển thị đường cong CV của điện cực vàng và điện cực cacbon.

3.4.2. Độ nhạy và giới hạn phát hiện

- **Độ nhạy của cảm biến** được xác định bằng độ dốc của đường hồi quy tuyến tính [122], giữa tín hiệu điện hoá $\% \Delta I_{max}$ và nồng độ protein VP28. Mối quan hệ tuyến tính có thể biểu diễn dưới dạng:

$$\% \Delta I_{max} = S \times C_M + b \quad (3.2)$$

Trong đó, S là độ nhạy, C_M là nồng độ chất phân tích.

- Giới hạn phát hiện LOD (Limit of Detection) được tính theo công thức:

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad (3.3)$$

Trong đó, σ là độ lệch chuẩn của tín hiệu nền. Độ lệch chuẩn được tính dựa trên độ biến thiên điện trở truyền điện tích của 3 giá trị mẫu trắng thu được từ điện cực được chức năng hoá kháng thể anti-VP28 theo công thức sau:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^3 (\Delta R_{CTi} - \overline{\Delta R_{CT}})^2}{3-1}} \quad (3.4)$$

3.4.3. Độ lặp lại, độ ổn định và độ tái lập

Để đánh giá độ lặp lại, mỗi phép đo phát hiện protein VP28 được thực hiện bốn lần liên tiếp trên cùng một cảm biến, đồng thời lặp lại trên ba cảm biến khác nhau được chức năng theo cùng quy trình, cùng thời điểm. Giá trị dòng cực đại I_{max} thu được ở từng phép đo được thống kê dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD), qua đó tính hệ số biến thiên (RSD%) để phản ánh độ ổn định của tín hiệu và khả năng tái lập giữa các điện cực.

3.4.4. Độ đặc hiệu

Để đánh giá độ đặc hiệu cảm biến được ủ trong dung dịch chứa kháng nguyên VP28 (15 ng/mL) có bổ sung thêm protein gây nhiễu (NSE). Tín hiệu thu được so sánh với tín hiệu từ dung dịch chỉ chứa VP28 tinh khiết ở cùng nồng độ. Độ chênh lệch $\% \Delta I_{max}$ thể hiện khả năng nhận biết đặc hiệu cao với VP28, không bị ảnh hưởng bởi các protein không đặc hiệu khác trong môi trường đo.

Kết luận chương

Chương 3 đã hoàn thiện việc thiết lập thực nghiệm và xây dựng nền tảng kỹ thuật cho quá trình phát triển hệ thống cảm biến điện hóa phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV). Trong chương này, hệ thống đo lường điện hóa di động không dây WPEMS đã được thiết kế và xây dựng nhằm phục vụ phát hiện protein VP28 – protein vỏ đặc trưng của WSSV, đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán bệnh tôm đốm trắng. Hệ thống bao gồm cảm biến miễn dịch điện hóa với điện cực làm việc được chức năng hóa kháng thể anti-VP28, khối mạch đo và điều khiển tích hợp, cùng giao diện người dùng cho phép hiển thị và lưu trữ dữ liệu đo trên nền tảng máy tính Windows và thiết bị Android.

Trước khi triển khai các thí nghiệm với protein VP28 và mẫu WSSV, các thí nghiệm khảo sát ban đầu sử dụng protein BSA-FITC đã được thực hiện nhằm đánh giá khả năng hình thành SAM, hiệu quả cố định kháng thể và khả năng bắt giữ

kháng nguyên trên bề mặt điện cực. Các kết quả kiểm chứng thông qua tín hiệu huỳnh quang và tín hiệu điện hóa giúp xác nhận tính khả thi và độ ổn định của bề mặt điện cực sau chức năng hóa, qua đó làm cơ sở cho việc xây dựng và tối ưu các quy trình phát hiện protein VP28 và mẫu WSSV.

Tiếp theo, chương trình bày chi tiết quy trình chức năng hóa điện cực, bao gồm các bước phủ hạt nano vàng nhằm cải thiện đặc tính điện hóa, hình thành lớp SAM, hoạt hóa và cố định kháng thể đặc hiệu anti-VP28, cũng như các phương pháp điện hóa được sử dụng để theo dõi sự thay đổi đặc trưng của bề mặt điện cực sau từng giai đoạn biến tính, từ đó thu nhận tín hiệu phát hiện nồng độ protein VP28.

Các kỹ thuật CV, SWV, EIS triển khai trên hệ đo thương mại được áp dụng nhằm đảm bảo khả năng đánh giá toàn diện hoạt động của cảm biến. Trên cơ sở đó, quy trình chức năng hóa và đo lường được áp dụng và hiệu chỉnh để phát hiện nồng độ protein VP28 tinh khiết và mẫu WSSV trên hệ đo điện hóa WPEMS đã xây dựng.

Những thiết lập thực nghiệm, quy trình chức năng hóa và hệ thống đo điện hoá được xây dựng trong Chương 3 là cơ sở cho việc đánh giá hiệu năng, độ nhạy, giới hạn phát hiện, độ ổn định, độ tái lập và khả năng ứng dụng thực tế của hệ thống cảm biến điện hóa phát hiện WSSV. Các kết quả và thảo luận chi tiết sẽ được trình bày trong Chương 4.

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong chương này, các kết quả thu được từ quá trình hiệu chuẩn và kiểm chứng cấu phần cảm biến điện hóa được trình bày và thảo luận dựa trên các quy trình phát hiện hai protein mục tiêu: (1) protein BSA-FITC trên điện cực SPAuE để chứng minh vai trò của SAM (MUA, L-Cysteine) trong cố định đầu thu sinh học và bắt giữ kháng nguyên; (2) protein VP28 trên điện cực SPCE với quy trình phủ AuNPs, hình thành SAM, cố định anti-VP28 và phát hiện nồng độ VP28.

Bên cạnh các kết quả liên quan đến cấu phần cảm biến, chương này trình bày kết quả thiết lập và đánh giá hiệu năng của hệ thống đo điện hóa di động không dây WPEMS cho mục tiêu phát hiện VP28 – protein vỏ đặc trưng của vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV. Các kết quả thực nghiệm cho thấy hệ thống đo CV trên điện cực vàng được chức năng hóa bằng kháng thể đặc hiệu anti-VP28 đạt mối tương quan tuyến tính mạnh giữa phần trăm biến thiên dòng điện đỉnh ($\% \Delta I_{max}$) và nồng độ VP28 trong khoảng 5 – 25 ng/mL ($R^2 = 0,994$) với giới hạn phát hiện LOD đạt 2,38 ng/mL.

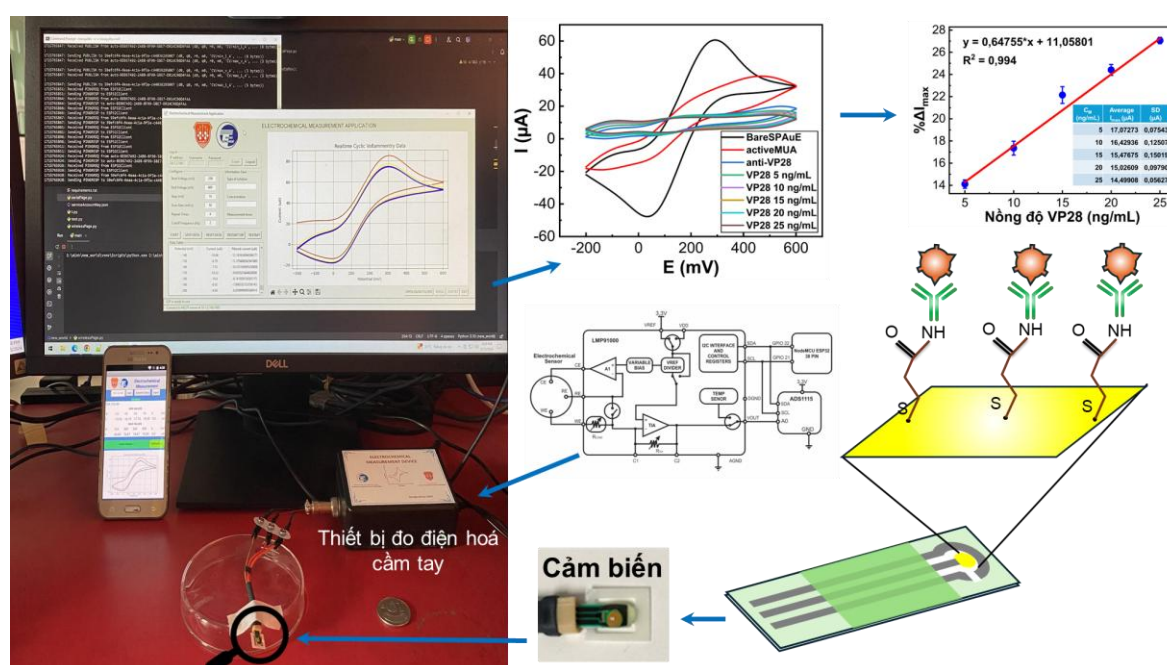
Hệ thống cho phép hiển thị và lưu trữ dữ liệu theo thời gian thực thông qua kết nối có dây và không dây, có thể đáp ứng yêu cầu phát hiện tại chỗ và cảnh báo WSSV trong môi trường nuôi tôm. Ngoài ra, chương này còn trình bày các kết quả đánh giá về khả năng lặp lại, độ ổn định, độ chọn lọc, và kết quả kiểm chứng bước đầu khả năng phát hiện WSSV trên mẫu tôm dương tính.

4.1. Kết quả thiết lập hệ thống

4.1.1. Kết quả xây dựng phần cứng

Hệ thống đo tín hiệu sinh học điện hóa ứng dụng công nghệ IoT với 3 thành phần chính gồm mạch điều khiển, phần mềm điều khiển và ứng dụng hiển thị. Mạch điều khiển được cấp nguồn 5 V, sử dụng module điều khiển ESP32 để cấu hình mạch Potentiostat LMP91000 và thu thập dữ liệu từ bộ chuyển đổi tương tự-số ADS1115 (16 bit), được cấu hình với độ phân giải hiệu dụng 14 bit. Hệ thống hỗ trợ dải điện áp đo từ -825 mV đến +825 mV. Dữ liệu sau khi thu nhận được ESP32

truyền đến phần mềm điều khiển để xử lý và hiển thị. Phần mềm điều khiển được lập trình bằng ngôn ngữ lập trình Python với giao diện người dùng thân thiện và dễ sử dụng để nhận tín hiệu, vẽ đồ thị trực quan hóa theo thời gian thực. Sau đó, phần mềm điều khiển sẽ xử lý và lọc nhiễu và vẽ lại đồ thị sau khi lọc, trích xuất các giá trị cần thiết bao gồm giá trị nhỏ nhất, lớn nhất của dòng điện, tính toán nồng độ và gửi đến ứng dụng hiển thị. Ứng dụng hiển thị trên điện thoại thông minh hệ điều hành Android với cách thức sử dụng đơn giản và tối giản hóa việc trực quan hóa dữ liệu như Hình 4.1. Các thành phần chính được cải tiến kết nối không dây bằng giao thức truyền thông MQTT.



Hình 4.1. Kết quả thiết kế hệ thống.

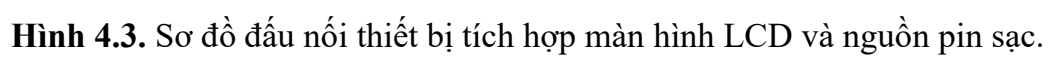
Trong đó, thiết bị đo điện hoá di động không dây WPEMS trên thực tế chính là hệ mạch điều khiển hoàn thiện được mô tả trên Hình 4.2, gồm ba khối chính: khối giao tiếp điện cực, mạch đo điện hoá, và mạch điều khiển ESP32. Điện cực SPAuE kết nối với thiết bị là hệ ba điện cực gồm điện cực làm việc (WE), điện cực so sánh (RE) và điện cực đối (CE). Trong mạch đo, LMP91000 đóng vai trò giao tiếp điện hoá, thiết lập và duy trì điện thế giữa WE và RE bằng cách điều khiển CE, đồng thời chuyển đổi dòng phản ứng tại WE thành điện áp đầu ra V_{out} thông qua bộ

khuếch đại chuyển dòng–điện áp TIA. Tín hiệu V_{out} được số hoá bởi bộ chuyển đổi ADC (module ADS1115) và truyền đến ESP32 qua giao tiếp I²C để xử lý và hiển thị. Hệ thống có thể thực hiện quét thế tuần hoàn (CV) qua kết nối không dây, với tốc độ truyền và độ chính xác tín hiệu tương đương với phép đo CV có dây. Thiết bị có kích thước tổng thể 100 mm × 70 mm × 38 mm (dài × rộng × cao), khối lượng 128 gram.



Hình 4.2. Thiết bị đo điện hoá di động không dây WPEMS.

Để đáp ứng yêu cầu triển khai trong các ứng dụng thực địa, hệ đo điện hoá được thiết kế cải tiến theo hướng vận hành độc lập, sử dụng nguồn pin sạc tích hợp và màn hình hiển thị trực tiếp các thông số đo. Hình 4.3 là sơ đồ cấp nguồn và kết nối phần cứng của hệ đo điện hoá sử dụng pin sạc, hiển thị trực tiếp phục vụ ứng dụng thực địa. Hệ thống sử dụng nguồn pin sạc gồm hai cell LiFePO₄ (1) điện áp danh định 3,2 V mắc nối tiếp, tạo thành bộ pin 2S–6,4 V, kết hợp với mạch cân bằng pin (2) nhằm bảo đảm an toàn và ổn định trong quá trình sạc–xả.



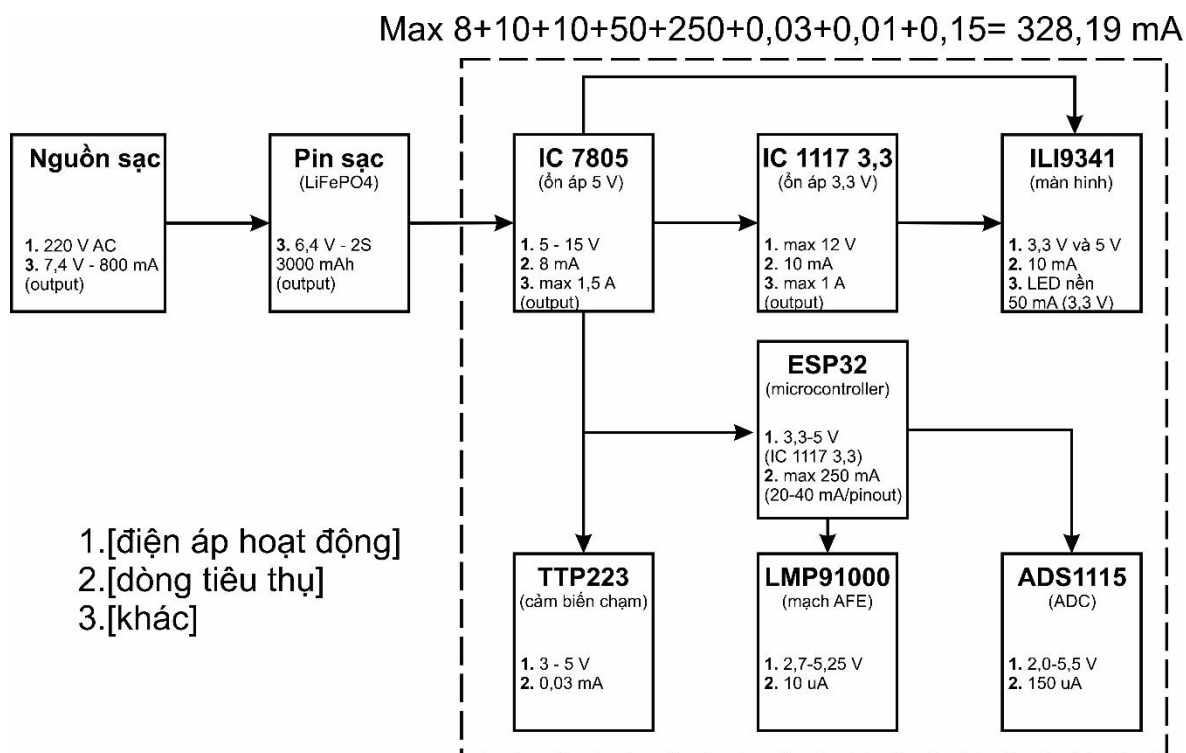
Điện áp từ bộ pin được phân phối qua các mạch ổn áp để tạo ra hai mức điện áp chính là 5 V và 3,3 V, phục vụ cho các khối chức năng khác nhau của thiết bị. Sau module ổn áp 7805 (3), nguồn 5 V được dùng làm nguồn VCC cho module màn hình ILI9341 (5), cảm biến chạm TTP223 (6) và nguồn VDD cho module điều khiển ESP32 (7). Sau module AMS1117 (4), nguồn 3,3 V được sử dụng để cấp cho LED nền của màn hình ILI9341 (5). Việc bố trí đường cấp nguồn 3,3 V độc lập cho LED nền giúp bảo đảm khả năng hiển thị liên tục mà không ảnh hưởng đến độ ổn định của khối đo điện hóa, hạn chế hiện tượng sụt áp và nhiễu nguồn, đặc biệt trong quá trình quét thế khi dòng tiêu thụ của mạch đo thay đổi.

Mạch Potentiostat LMP91000 đã được tùy chỉnh để hoạt động với nguồn VDD = 3,3 V. LMP91000 (8) và ADS1115 (9) được cấp nguồn trực tiếp từ đường 3,3 V trên module ESP32. Trong cấu hình đo, chân V_{ref} của LMP91000 được nối trực tiếp với VDD = 3,3 V nhằm thiết lập mức tham chiếu ổn định. Tín hiệu đầu ra V_{out} của LMP91000 được kết nối với chân analog A0 của ADS1115 để thực hiện quá trình số hoá tín hiệu dòng điện điện hoá.

Tụ điện phân cực 10 μ F/25 V được mắc giữa chân EN và GND của ESP32, cho phép hỗ trợ quá trình khởi động và nạp chương trình trực tiếp lên mạch điều khiển mà không cần thao tác nhấn giữ nút “BOOT”, góp phần nâng cao tính thuận tiện khi triển khai thiết bị trong các ứng dụng thực địa.

Hình 4.4 minh họa sơ đồ phân phối điện áp và dòng tiêu thụ của hệ đo điện hoá cầm tay. Việc liệt kê và tổng hợp dòng tiêu thụ của các khối chức năng, bao gồm vi điều khiển ESP32, mạch đo điện hoá LMP91000, bộ chuyển đổi tương tự-số ADS1115, màn hình ILI9341 và các mạch ngoại vi, cho phép xác định dòng tiêu thụ cực đại của toàn hệ thống, làm cơ sở đánh giá khả năng vận hành độc lập của thiết bị trong điều kiện thực địa. Với adapter 7,4 V–800 mA và bộ pin LiFePO₄ cấu hình 2S–1500 mAh kết hợp module sạc/bảo vệ 2S, quá trình sạc được thực hiện theo cơ chế CC–CV, trong đó dòng sạc tương đương khoảng 0,53C, bảo đảm an toàn và độ bền cho pin. Dựa trên dòng tiêu thụ cực đại xấp xỉ 328 mA, thời gian vận

hành liên tục của thiết bị được ước lượng trong khoảng 3,5–4,0 giờ khi bật đầy đủ các chức năng, bao gồm đo điện hoá, hiển thị màn hình và truyền, nhận dữ liệu không dây.

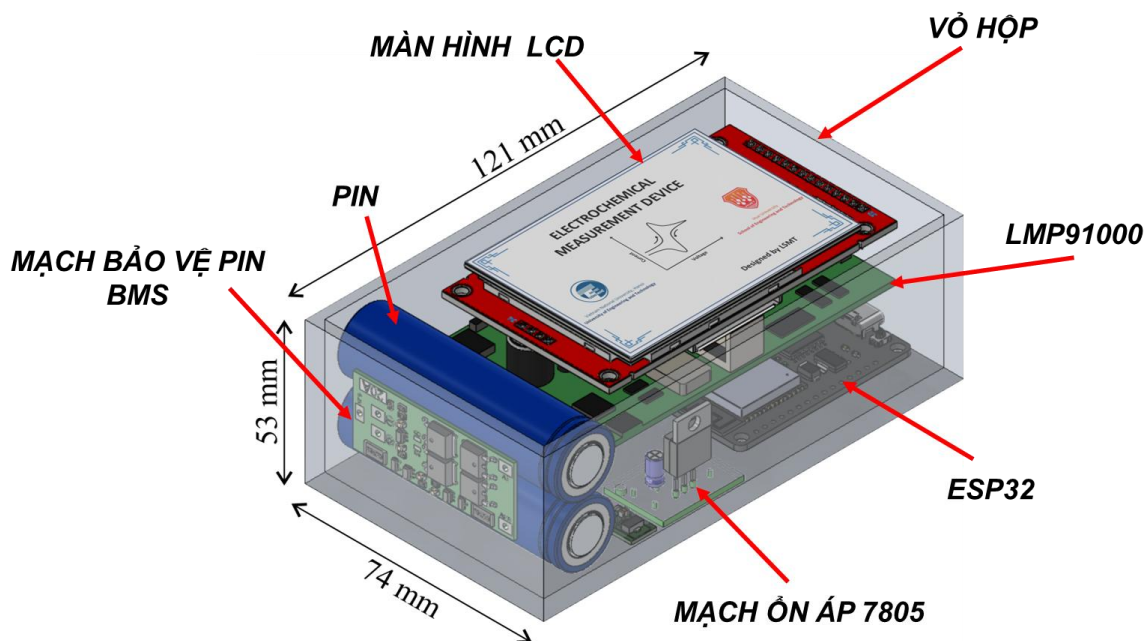


Hình 4.4. Sơ đồ cấp nguồn, phân phối điện áp và dòng tiêu thụ của hệ đo điện hoá cầm tay.

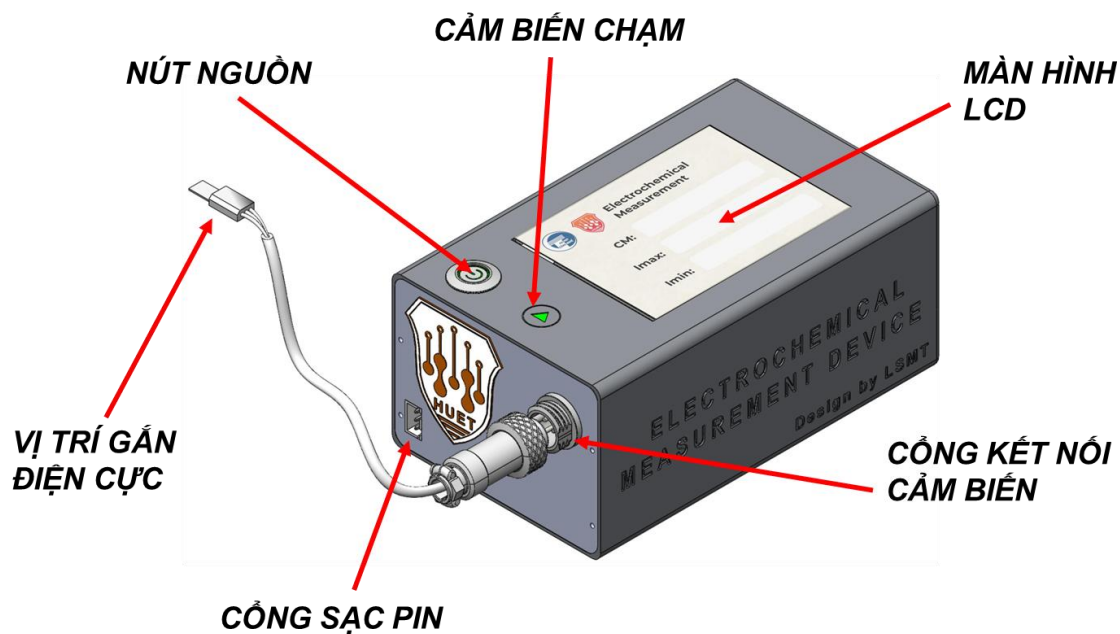
Bố trí chi tiết các module phần cứng của hệ đo được minh họa trong Hình 4.5. Trong cấu hình này, bảng mạch chính chứa ESP32, LMP91000 và ADS1115 được bố trí ở khu vực trung tâm của thiết bị. Hệ thống pin và mạch quản lý nguồn được đặt tách biệt về một phía của vỏ, nhằm rút ngắn đường cấp nguồn, hạn chế nhiễu từ khối nguồn lan sang khối đo điện hoá, đồng thời đảm bảo an toàn trong quá trình sử dụng.

Kích thước tổng thể của thiết kế cũng được thể hiện trong hình, với các thông số hình học lần lượt là 121 mm × 74 mm × 53 mm (dài × rộng × cao). Kích thước này cho thấy hệ đo có thiết kế gọn, thuận tiện cho việc di chuyển, bố trí và sử dụng trong phòng thí nghiệm hay thực địa. Không gian bên trong vỏ được phân bổ

hợp lý, đảm bảo các module không tác động cơ học lẫn nhau trong quá trình vận hành liên tục.



Hình 4.5. Thiết kế 3D bố trí bên trong vỏ thiết bị.

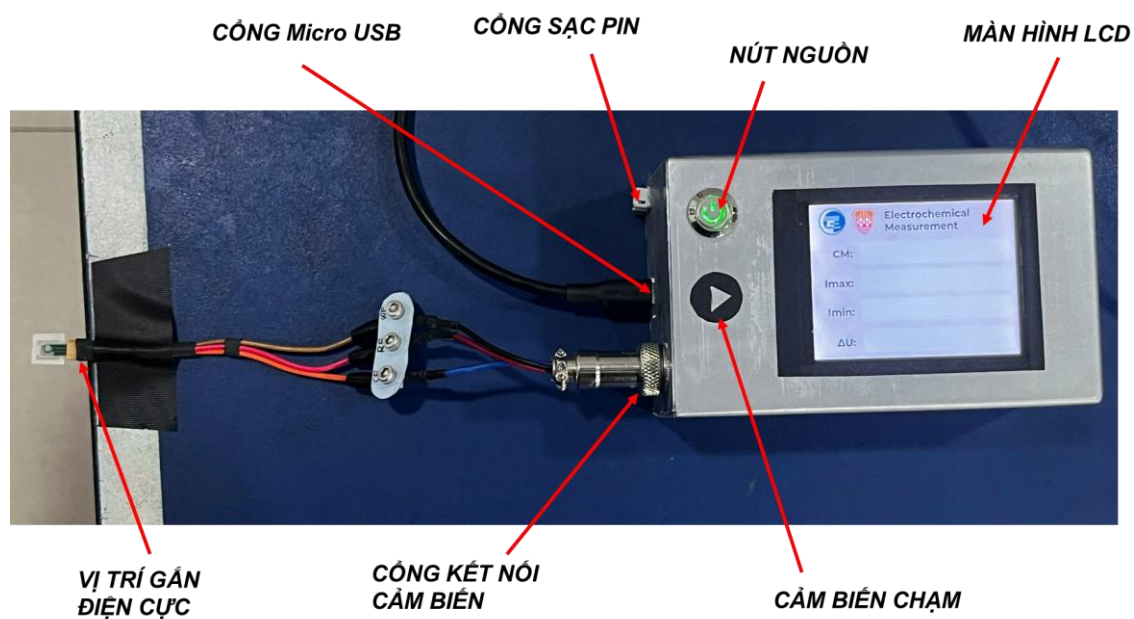


Hình 4.6. Thiết kế 3D bố trí bên ngoài vỏ thiết bị.

Hình 4.6 minh họa thiết kế 3D tổng quan bên ngoài của thiết bị đo điện hoá sau khi tích hợp hoàn chỉnh các khối chức năng. Thiết bị được trang bị màn hình

LCD hiển thị trực tiếp các thông số đo, nút nhấn điều khiển phục vụ thao tác khởi động vận hành, cổng kết nối điện cực đo điện hoá, cổng sạc pin và cổng giao tiếp USB. Toàn bộ các thành phần được bố trí gọn gàng trong vỏ bảo vệ, bảo đảm tính cơ động, thuận tiện cho người sử dụng và phù hợp với việc triển khai các phép đo điện hoá trong điều kiện thực địa.

Trên cơ sở thiết kế và bố trí phần cứng nêu trên, toàn bộ các module gồm ESP32, LMP91000, ADS1115, màn hình hiển thị và hệ thống nguồn đã được lắp đặt và tích hợp thành một hệ đo hoàn chỉnh. Hình 4.7 là hình ảnh thực tế của thiết bị sau khi hoàn thiện với kích thước 121 mm × 74 mm × 53 mm (dài × rộng × cao), khối lượng 303 gram. Các module được kết nối đúng theo sơ đồ đấu nối đã thiết kế, sử dụng chung nguồn cấp, bảo đảm tính ổn định và đồng bộ trong quá trình vận hành.



Hình 4.7. Thiết bị hoàn chỉnh với màn hình và nguồn pin tích hợp.

Kết quả xây dựng phần cứng cho thấy hệ đo điện hoá đã được tích hợp hoàn chỉnh, có kích thước gọn nhẹ nhưng vẫn đáp ứng đầy đủ các yêu cầu kỹ thuật của phép đo quét thế tuần hoàn. Cấu trúc phần cứng được thiết kế hợp lý, đảm bảo tính

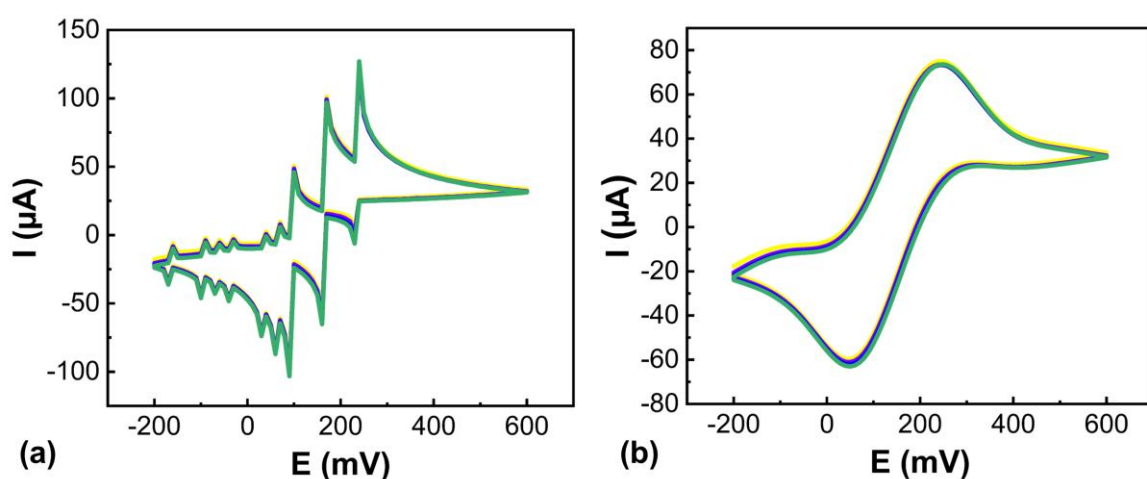
ổn định, độ tin cậy và khả năng vận hành độc lập của hệ thống, phù hợp cho cả nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và triển khai ứng dụng thực địa.

4.1.2. Kết quả phát triển phần mềm

Phần mềm điều khiển được lập trình để kết nối với mạch điều khiển qua máy chủ để thực hiện các phép đo CV không dây. Ngoài ra, phần mềm điều khiển vẫn có thể thực hiện các phép đo CV có dây khi cần thiết. Bên cạnh đó, phần mềm có thể nhập dữ liệu tín hiệu đã được đo trước đó và trích xuất các thông số cần thiết như giá trị cực đại, cực tiểu và tính toán nồng độ dựa trên dữ liệu tín hiệu được nhập vào.

4.1.2.1. Kết quả xử lý tín hiệu

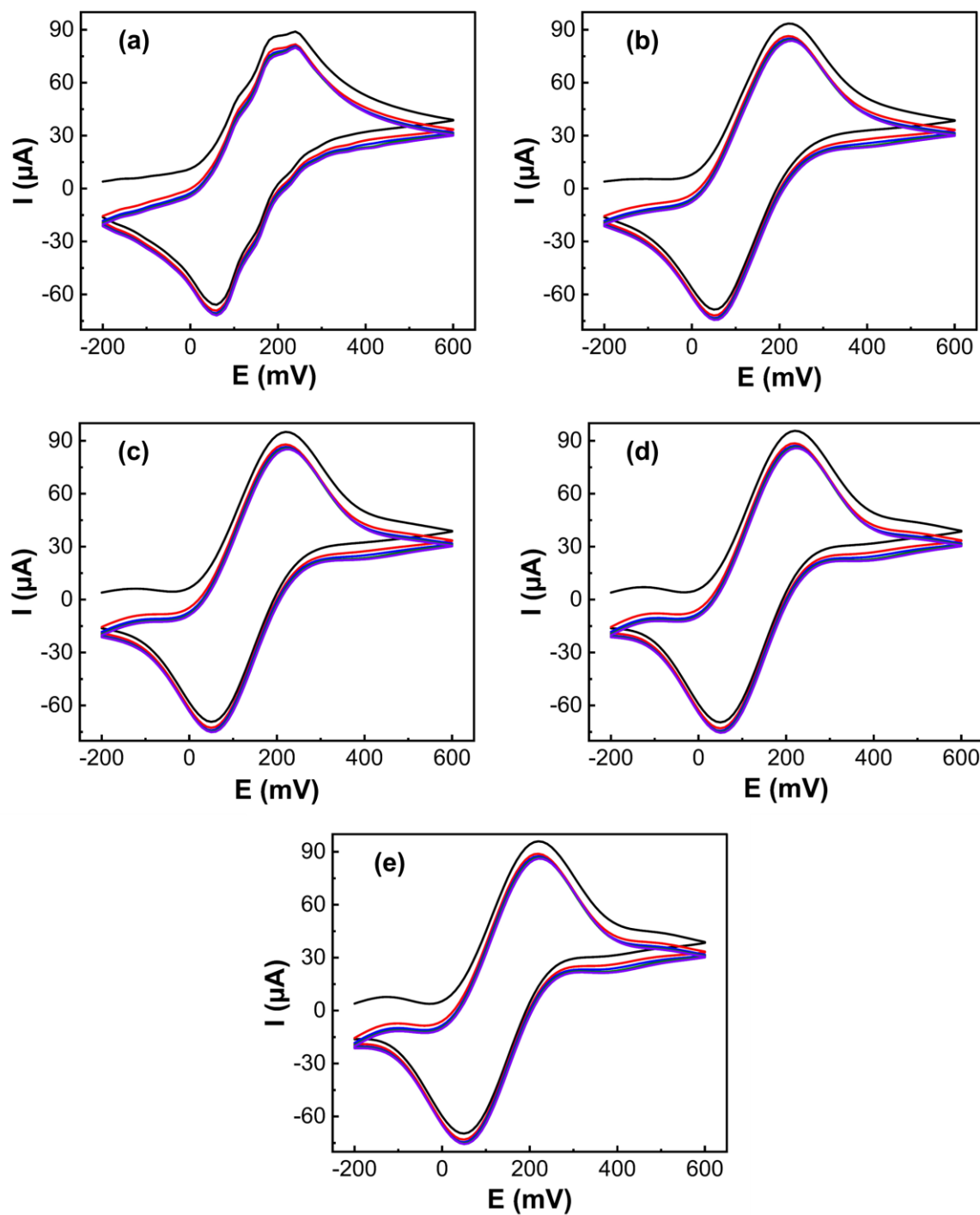
Hình 4.8 mô tả tín hiệu đo CV trước và sau khi lọc nhiễu. Hình 4.8a biểu diễn tín hiệu gốc thu được từ mạch điều khiển, trong đó vẫn tồn tại nhiều tần số cao. Để loại bỏ nhiễu này, bộ lọc thông thấp Butterworth đã được áp dụng. Kết quả cho thấy nhiễu tần số cao trong tín hiệu gốc đã được loại bỏ hiệu quả, giúp tín hiệu trở nên mượt hơn. Sau khi xử lý qua bộ lọc, tín hiệu thu được thể hiện dạng đặc trưng của đường cong quét thế tuần hoàn (CV) [123], như minh họa trong Hình 4.8b.



Hình 4.8. Tín hiệu đo CV (a) trước và (b) sau khi lọc nhiễu.

Việc lựa chọn bậc bộ lọc phù hợp có ảnh hưởng trực tiếp đến độ mượt của đường cong CV cũng như khả năng bảo toàn các đặc trưng điện hoá quan trọng của

tín hiệu. Để minh họa rõ ràng tác động của bậc bộ lọc thông thấp đến dạng tín hiệu CV, Hình 4.9 trình bày kết quả khảo sát đáp ứng của hệ đo khi áp dụng các bộ lọc Butterworth với bậc khác nhau.



Hình 4.9. Kết quả khảo sát các bậc bộ lọc: (a) bậc 1; (b) bậc 2; (c) bậc 3; (d) bậc 4; (e) bậc 5.

Quan sát tín hiệu sau khi lọc với bộ lọc Butterworth từ bậc 1 đến bậc 5 (Hình 4.9a–e) cho thấy sự thay đổi rõ rệt độ mượt tín hiệu cùng với việc giữ nguyên hình thái đặc trưng của đường cong von–ampe. Cụ thể, bộ lọc với bậc thấp (bậc 1, Hình 4.9a) vẫn còn tồn tại các gai nhiễu, phản ánh khả năng lọc nhiễu còn hạn chế. Khi tăng bậc lọc lên mức trung bình (bậc 2 và 3, Hình 4.9b–c), tín hiệu CV trở nên mượt và rõ nét hơn, đồng thời vẫn duy trì được cấu trúc đỉnh oxy hoá–khử đặc trưng của phản ứng điện hoá. Ngược lại, khi sử dụng các bộ lọc bậc cao hơn (bậc 4 và 5, Hình 4.9d–e), dạng đường cong tín hiệu bắt đầu có thay đổi đáng kể. Trong trường hợp này, đường cong von–ampe không chỉ được làm mượt mà còn có xu hướng làm tròn đỉnh, giảm và dần mất đi tính đối xứng của phản ứng thuận nghịch - đặc trưng của quá trình oxy hoá–khử. Hiện tượng này cho thấy việc lọc quá mức đã làm sai lệch hình thái của tín hiệu điện hoá thu được, từ đó có thể ảnh hưởng đến độ chính xác của việc phân tích các tham số đặc trưng.

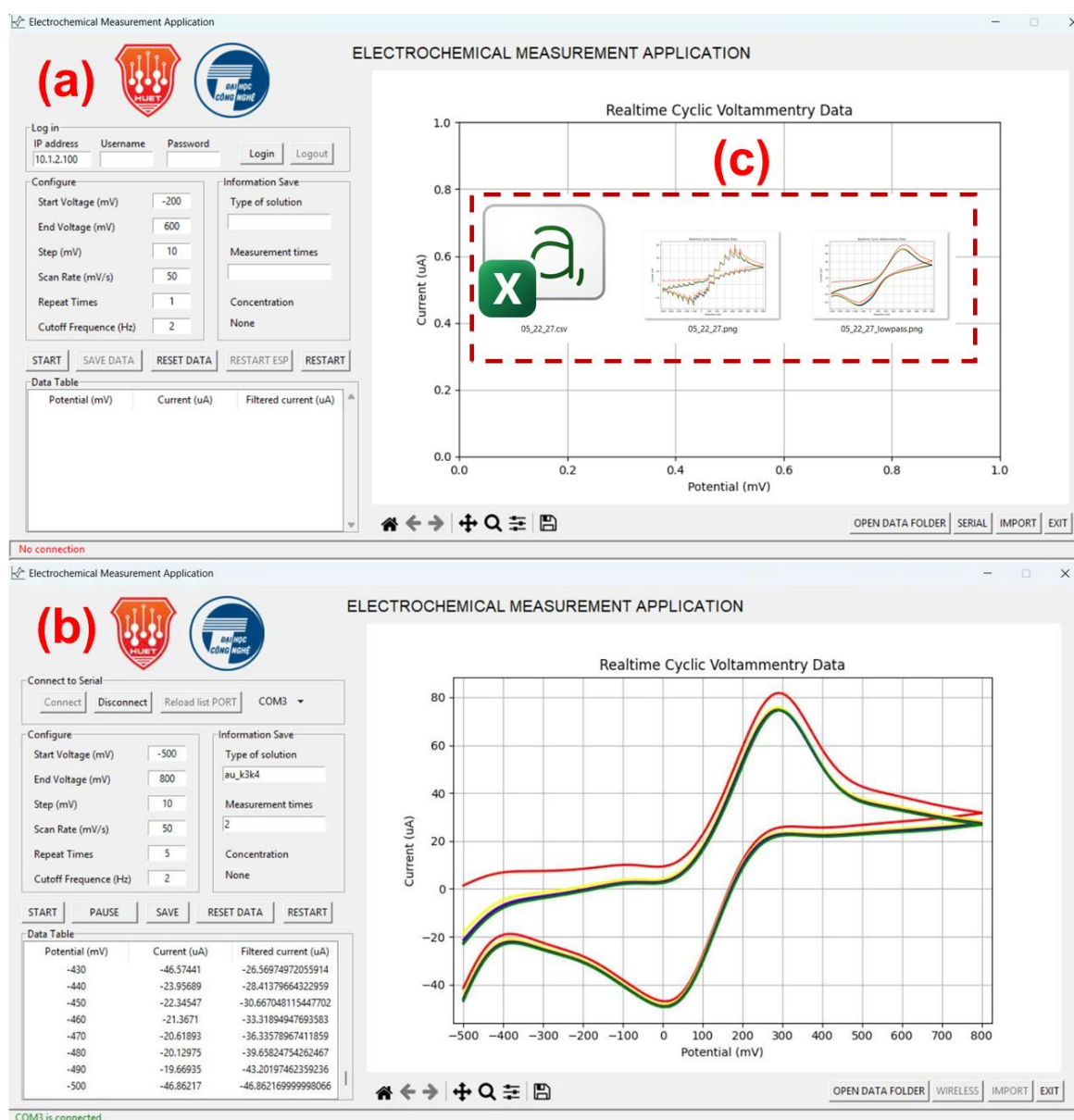
Như vậy, hệ thống đo điện hóa di động đã được thiết kế với các giải pháp đồng bộ ở cả phần cứng và phần mềm nhằm nâng cao độ ổn định và giảm nhiễu tín hiệu. Về phần cứng, module LMP91000 thực hiện điều khiển hệ điện cực và khuếch đại tín hiệu, kết hợp với bộ chuyển đổi tương tự–số ADS1115 đặt gần khối đo để rút ngắn đường truyền tín hiệu analog và hạn chế nhiễu. Hệ thống sử dụng nguồn pin tích hợp, được chuyển đổi và ổn áp với các mức điện áp 5 V và 3,3 V cấp riêng cho các khối chức năng, góp phần bảo đảm độ ổn định nguồn cấp. Về phần mềm, bộ lọc số thông thấp Butterworth bậc 3 được lập trình bằng Python đã loại bỏ nhiễu cao tần mà vẫn giữ nguyên đặc trưng của các đỉnh oxy hoá–khử.

4.1.2.2. Kết quả xây dựng giao diện người dùng

a. Trên máy tính hệ điều hành Windows

Giao diện người dùng được xây dựng và cài đặt trên máy tính sử dụng hệ điều hành Windows. Giao diện cho phép người dùng thao tác chọn chế độ đo, cài đặt các thông số và điều khiển quá trình đo điện hoá. Chế độ đo có thể là có dây, không dây. Các thông số là dải điện áp, bước điện áp, tốc độ, số vòng quét, tần số

cất. Trong quá trình vận hành, phần mềm hiển thị đường cong quét thế tuần hoàn (CV) theo thời gian thực, lọc, vẽ đồ thị sau lọc, xuất nồng độ và lưu dữ liệu. Dữ liệu lưu gồm file .csv dạng bảng gồm giá trị điện thế và dòng điện, đồ thị trước khi lọc và sau khi lọc. Các nút chức năng như *Start*, *Save Data*, *Reset Data*, *Restart*, *Restart ESP* giúp người dùng dễ dàng thao tác, theo dõi và quản lý dữ liệu đo. Giao diện trực quan, thân thiện, phù hợp cho các thao tác điều khiển và phân tích tín hiệu điện hoá trên máy tính.

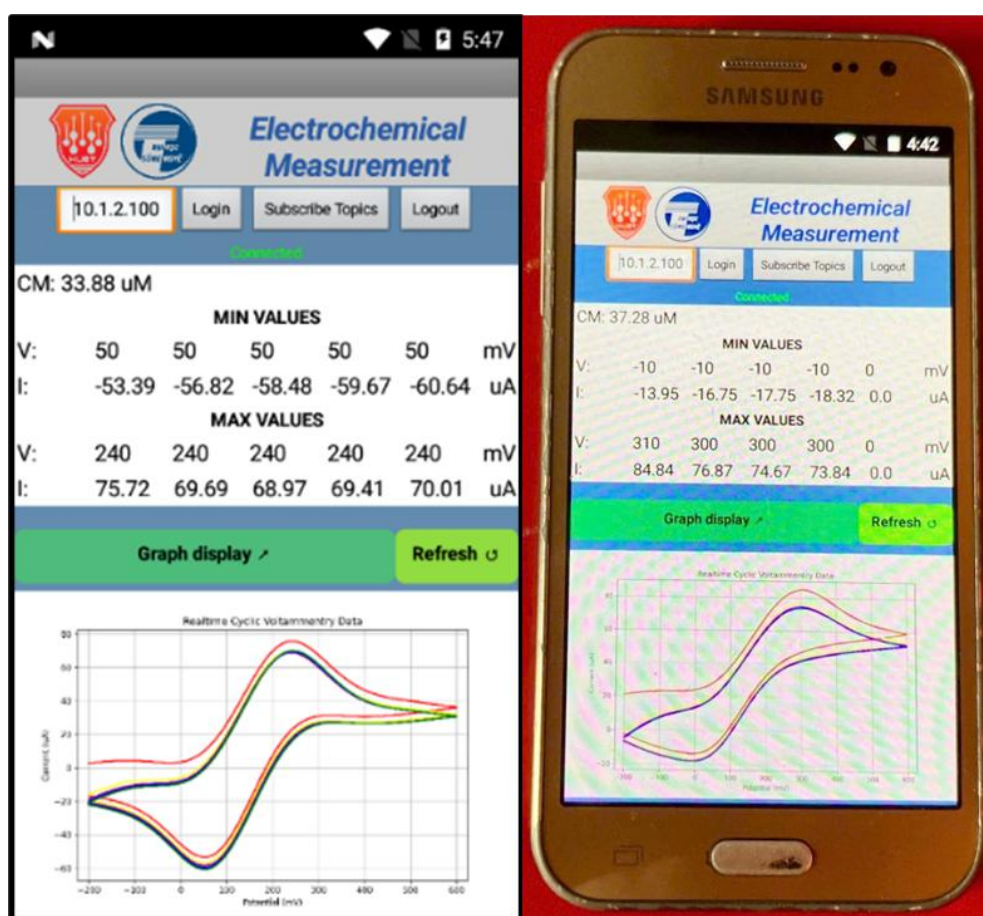


Hình 4.10. Giao diện người dùng trên máy tính hệ điều hành Windows: (a) Giao diện khởi động; (b) Giao diện sau khi đo; (c) Các file được lưu.

Hình 4.10 mô tả giao diện người dùng trên máy tính gồm giao diện khởi động (Hình 4.10a), giao diện sau khi đo (Hình 4.10b) và các file được lưu bao gồm file .csv số liệu đo, ảnh đồ thị tín hiệu trước và sau khi lọc (Hình 4.10c).

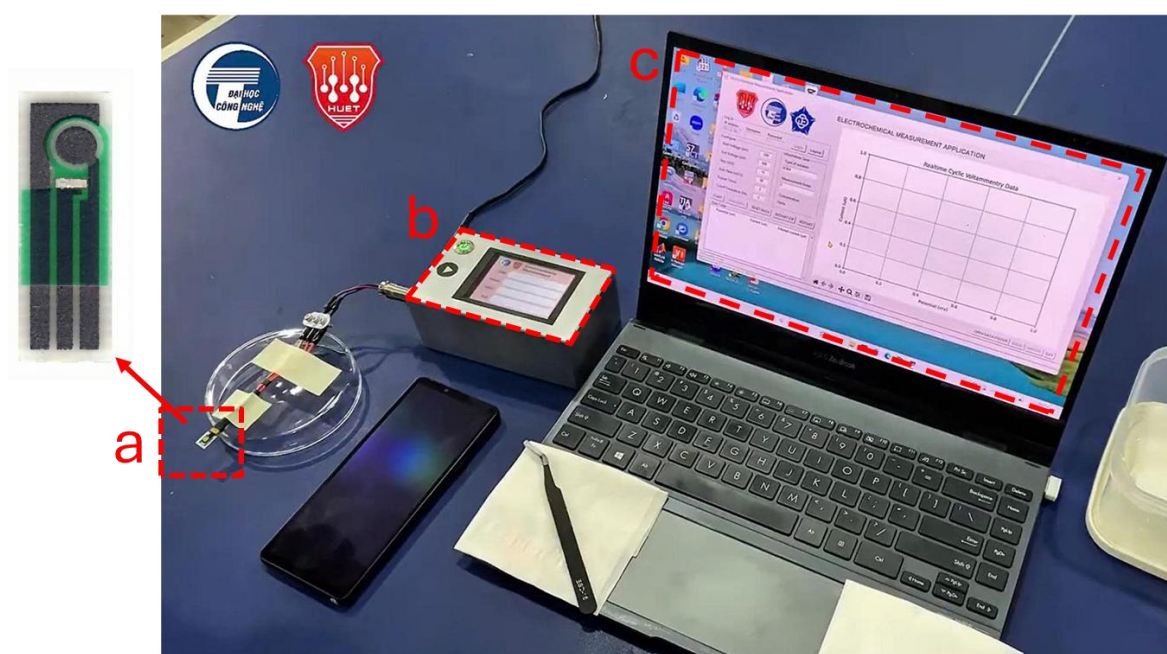
b. Trên điện thoại hệ điều hành Android

Ứng dụng giao diện người dùng được phát triển cho thiết bị di động sử dụng hệ điều hành Android, cho phép người dùng đăng nhập, chọn địa chỉ IP, theo dõi và hiển thị dữ liệu đo điện hoá. Ứng dụng hiển thị giá trị cực đại, cực tiểu của dòng điện, giá trị điện thế tương ứng, nồng độ và đồ thị CV trực tiếp trên màn hình. Các nút *Graph display* và *Refresh* giúp cập nhật đồ thị. Giao diện đơn giản, gọn nhẹ, hỗ trợ tốt cho việc quan sát và phân tích dữ liệu điện hoá ngay tại hiện trường, tăng tính linh hoạt và tiện dụng của hệ thống. Hình 4.11 mô tả giao diện người dùng trên điện thoại.



Hình 4.11. Giao diện người dùng trên điện thoại hệ điều hành Android.

Hình 4.12 minh họa tổng thể thiết lập kết nối của hệ đo điện hoá được xây dựng. Hệ thống bao gồm cảm biến hệ 3 điện cực (Hình 4.12a) được kết nối trực tiếp với thiết bị đo điện hoá (Hình 4.12b) thông qua jack cắm chuyên dụng. Thiết bị đo có nhiệm vụ tạo và điều khiển tín hiệu kích thích về thế điện cực, đồng thời thu nhận tín hiệu dòng điện phát sinh tại bề mặt điện cực trong quá trình phản ứng điện hoá. Dữ liệu đo được truyền về máy tính và hiển thị trên giao diện người dùng. Giao diện người dùng (Hình 4.12c), cho phép người vận hành thiết lập các tham số đo, theo dõi tín hiệu dòng–thế theo thời gian thực và lưu trữ dữ liệu phục vụ cho các bước xử lý và phân tích sau đo.



Hình 4.12. Thiết lập kết nối đo điện hoá: (a) điện cực; (b) thiết bị đo; (c) giao diện người dùng.

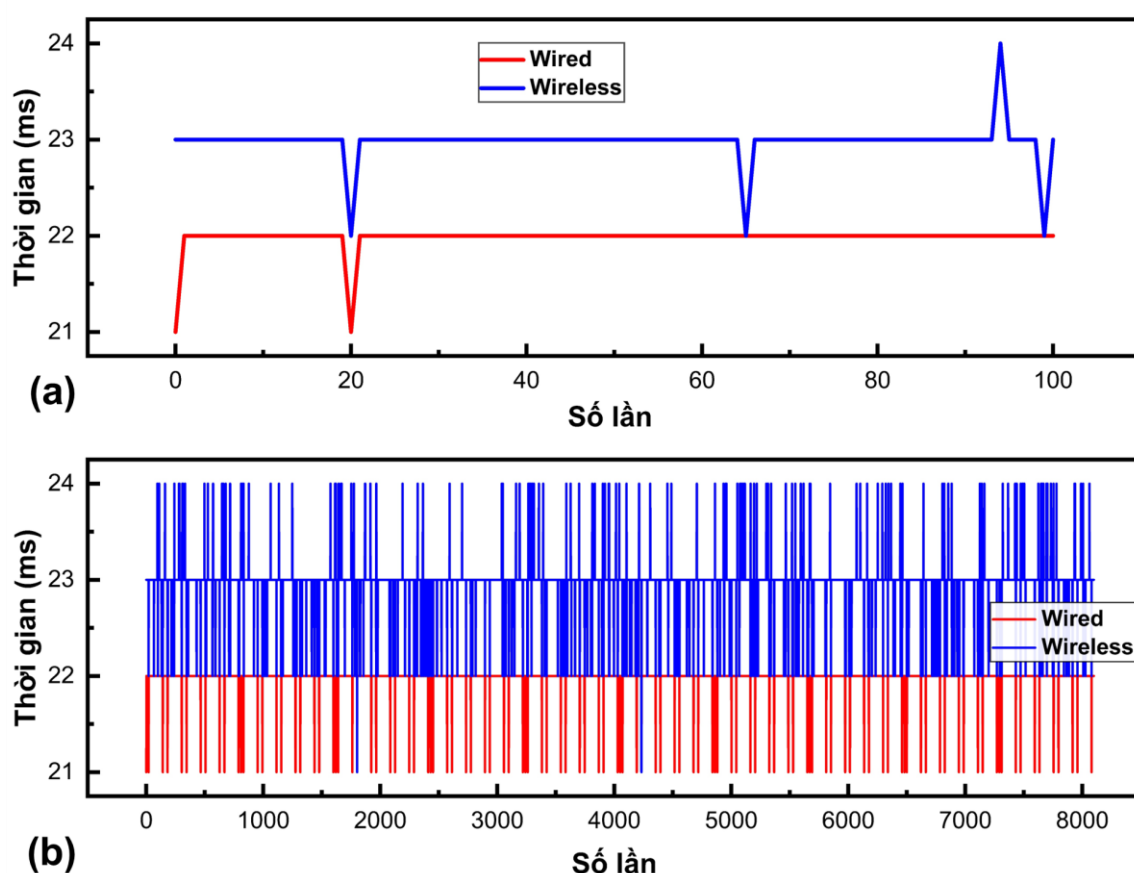
4.1.3. Đánh giá hiệu năng phản ứng

Đối với các phép đo CV, việc duy trì hoạt động liên tục của hệ thống và đảm bảo tính liên tục trong quá trình đo là rất quan trọng. Tiến hành quét CV 50 vòng trên dải điện áp từ -200 mV đến 600 mV, step 10 mV. Như vậy có tổng cộng 8100 lượt đo. Khảo sát 8100 lần truyền và nhận tín hiệu của mạch điều khiển đối với chế độ không dây và có dây:

- Kết nối có dây: tín hiệu từ (mạch điều khiển) đến (mạch đo) về (mạch điều khiển) đến (máy tính).

- Kết nối không dây: tín hiệu từ (mạch điều khiển) đến (mạch đo) về (mạch điều khiển) đến (server).

Kết quả khảo sát thể hiện trên Hình 4.13 cho thấy thời gian mỗi lần truyền nhận xấp xỉ từ 21-22 mili giây đối với kết nối có dây và khoảng 21-24 mili giây đối với kết nối không dây.

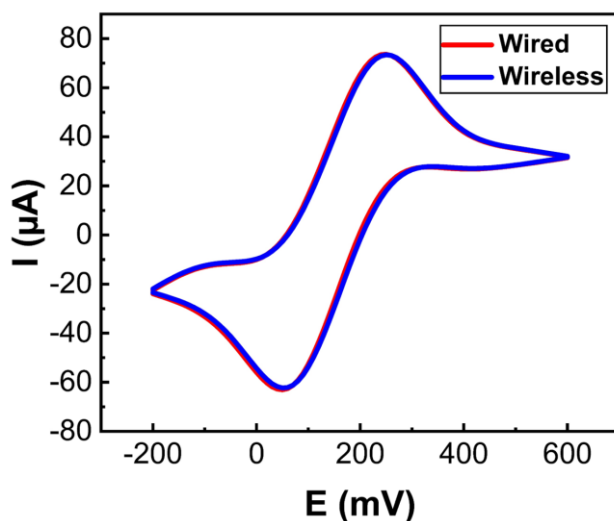


Hình 4.13. Kết quả khảo sát quá trình truyền và nhận tín hiệu ở chế độ có dây (Wired – đường màu đỏ) và không dây (Wireless – đường màu xanh): (a) 100 lượt; (b) 8100 lượt.

Giá trị trả về của các tín hiệu ở 2 chế độ có dây và không dây cũng được khảo sát qua đồ thị. Hình 4.14 mô tả tín hiệu CV được thu được từ cả kết nối có dây và không dây. Tín hiệu đạt đến giá trị cực đại (đỉnh anôt) ở khoảng 73,641 μA (có

dây) và ở khoảng 73,407 μA (không dây). Tín hiệu đạt giá trị cực tiểu (đỉnh catốt) ở khoảng -62,276 μA (có dây) và ở khoảng -63,021 μA (không dây). Những chênh lệch nhỏ này được giải thích bởi đặc tính sử dụng một lần của điện cực được sử dụng trong phép đo, dẫn đến sai số khi sử dụng lại điện cực trong lần đo sau đó.

Dựa trên kết quả khảo sát, có thể quan sát được độ trễ trong quá trình truyền, nhận tín hiệu giữa phép đo CV không dây, có dây và sự dao động trong đỉnh dòng điện. Tuy nhiên, những chênh lệch này không đáng kể, việc truyền và nhận tín hiệu vẫn liên tục và khớp nhau trong suốt quá trình đo ở cả kết nối có dây và không dây.



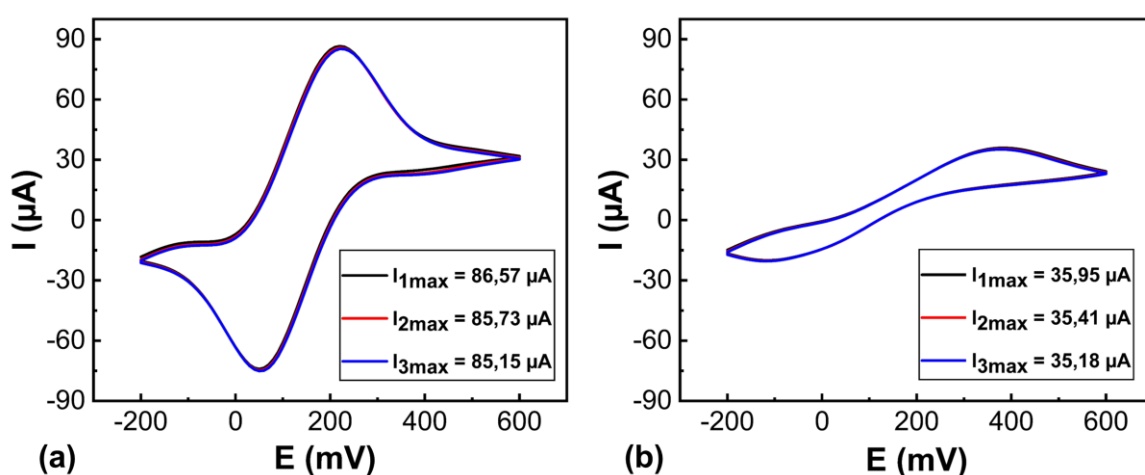
Hình 4.14. Hình dạng đồ thị CV ở các chế độ đo: Có dây (Wired – đường màu đỏ); Không dây (Wireless – đường màu xanh).

4.1.4. Khảo sát quét điện hoá điện cực vàng và điện cực cacbon

Kết quả khảo sát quét thế tuần hoàn trong ba chu kỳ liên tiếp trên hai loại điện cực: điện cực vàng và điện cực cacbon, dải điện áp từ -200 mV đến 600 mV được mô tả trên Hình 4.15. Kết quả cho thấy hệ thống đo và phần mềm xử lý tín hiệu CV hoạt động ổn định, chính xác và có độ lặp lại cao. Trong cả hai trường hợp, các đường cong CV thu được có dạng liên tục, rõ ràng và được ghi nhận đầy đủ ở cả nhánh quét thuận và nhánh quét nghịch, chứng tỏ hệ thống điều khiển thế và thu nhận dòng điện hoạt động đồng bộ và đáng tin cậy.

Đối với điện cực vàng, các đường cong CV thể hiện rõ các đỉnh oxy hóa đặc trưng ở thế đỉnh 220 mV, với $I_{1\max} = 86,57 \mu\text{A}$, $I_{2\max} = 85,73 \mu\text{A}$, $I_{3\max} = 85,15 \mu\text{A}$, giá trị trung bình đạt $85,82 \pm 0,71 \mu\text{A}$, độ lệch chuẩn tương đối 0,83%. Độ tách đỉnh thế $\Delta E_1 = \Delta E_2 = \Delta E_3 = \Delta E = 340 \text{ mV}$. Ba chu kỳ quét gần như chồng khít lên nhau, chỉ xuất hiện sai lệch rất nhỏ về giá trị dòng đỉnh; độ tách đỉnh thế không thay đổi. Kết quả này cho thấy độ ổn định cao của hệ thống đo theo thời gian và khả năng tái lập tốt của phần mềm trong việc điều khiển quá trình quét thế và ghi nhận tín hiệu điện hóa.

Ở thế đỉnh 380 mV, điện cực cacbon cho dòng đỉnh nhỏ hơn với $I_{1\max} = 35,95 \mu\text{A}$, $I_{2\max} = 35,41 \mu\text{A}$, $I_{3\max} = 35,18 \mu\text{A}$, giá trị trung bình đạt $35,51 \pm 0,40 \mu\text{A}$, độ lệch chuẩn tương đối 1,11%, biên độ tín hiệu thấp hơn so với điện cực vàng. Độ tách đỉnh thế thu được trên điện cực cacbon $\Delta E_1 = \Delta E_2 = \Delta E_3 = \Delta E = 500 \text{ mV}$ lớn hơn đáng kể so với điện cực vàng, phản ánh sự gia tăng phân cực điện hoá và điện trở truyền điện tích tại giao diện điện cực – dung dịch. Các kết quả này phù hợp với đặc tính dẫn điện và động học trao đổi electron của vật liệu cacbon. Tuy nhiên, các đường cong CV của ba chu kỳ vẫn thể hiện sự trùng khớp tốt, hình dạng đường cong không bị méo hay trôi tín hiệu, khẳng định phần mềm đo CV duy trì được độ chính xác và tính ổn định trong trường hợp thay đổi loại điện cực.



Hình 4.15. Kết quả khảo sát điện cực trần: (a) điện cực vàng; (b) điện cực cacbon.

Kết quả thu được trên hai loại điện cực khác nhau chứng minh rằng hệ thống và phần mềm đo quét thể tuần hoàn có khả năng hoạt động tin cậy, độ nhạy phù hợp và tính lặp lại cao, đáp ứng tốt yêu cầu khảo sát và phân tích các đặc tính điện hóa của nhiều loại vật liệu điện cực khác nhau.

4.1.5. Kết luận

Trên nền tảng Internet vạn vật (IoT) tiên tiến, hệ thống WPEMS thực hiện phép đo điện hoá, xuất dữ liệu đo và các dữ liệu liên quan theo thời gian thực. Kết quả có thể truy cập thuận tiện trên máy tính Windows và điện thoại thông minh Android thông qua kết nối có dây hoặc không dây. Các khảo sát cho thấy độ tin cậy và khả năng tương thích cao của quá trình truyền nhận dữ liệu ở cả hai phương thức kết nối. Hệ thống đo điện hoá cải tiến này mang lại thiết bị đo di động, thân thiện với người dùng nông dân, là giải pháp khả thi hỗ trợ phát hiện tại chỗ protein VP28 trong quá trình nuôi tôm.

Việc tích hợp cảm biến điện hoá và thiết bị đo lường với phần mềm trên máy tính hoặc điện thoại thông minh thông qua kết nối không dây cho phép giám sát và xử lý dữ liệu theo thời gian thực, đồng thời hỗ trợ chia sẻ dữ liệu từ xa phục vụ chẩn đoán bệnh và theo dõi môi trường.

Tiếp theo, luận án trình bày các kết quả nghiên cứu về quy trình chức năng hoá bề mặt điện cực nhằm phát hiện đặc hiệu vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV.

4.2. Kết quả khảo sát, đánh giá hệ thống

4.2.1. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC

Các thí nghiệm trên cặp hoá chất anti-BSA/BSA-FITC được triển khai và đánh giá ban đầu. Kết quả của quy trình đối với cặp hoá chất này là cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo đối với mục tiêu WSSV.

4.2.1.1. Kết quả khảo sát tốc độ quét và bước thế (E step) trong quét CV của điện cực vàng

Khảo sát quét 5 vòng CV điện cực SPAuE trần ở tốc độ quét 40 mV/s và 50 mV/s trong dải bước thế E-step từ 2 đến 15 mV, quan sát sự trùng lặp tín hiệu và ghi lại giá trị dòng điện đỉnh cực đại anốt. Kết quả dòng điện đỉnh anốt được thể hiện trên Bảng 4.1. E-step và tốc độ quét được lựa chọn dựa trên giá trị dòng cực đại thu được và khả năng lặp lại của tín hiệu. Kết quả cho thấy tốc độ quét 50 mV/s và bước thế 10 mV cho tín hiệu ổn định, tái lập tốt nhất và dòng đỉnh cao nhất do đó được chọn cho các phép đo điện hóa tiếp theo.

Bảng 4.1. Khảo sát tốc độ quét và E step.

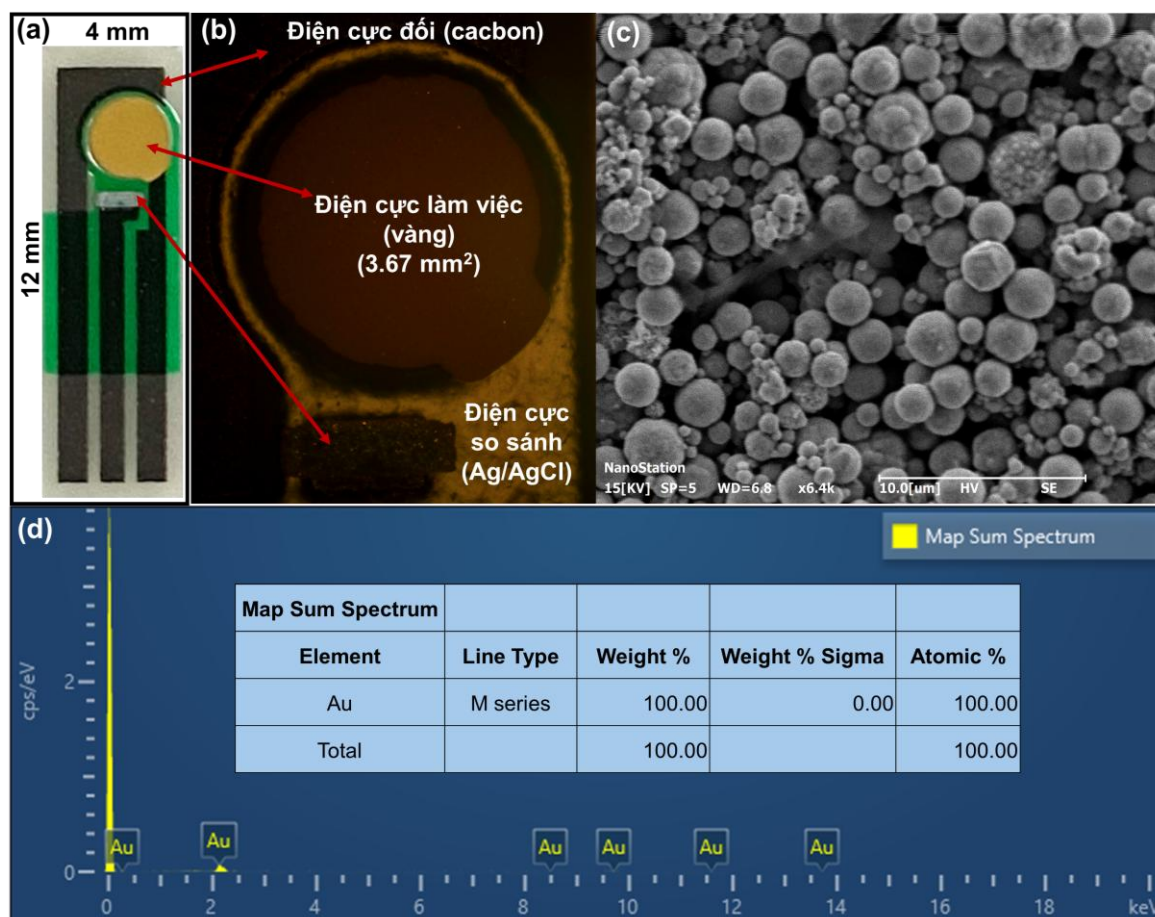
Tốc độ quét 40 mV/s														
E step (mV)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I _{pa} (μA)	114,68	114,55	113,76	111,34	110,53	110,01	109,77	107,37	103,48	106,02	101,71	103,01	100,13	100,69

Tốc độ quét 50 mV/s														
E step (mV)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I _{pa} (μA)	107,06	114,56	117,43	118,01	118,43	118,02	119,12	119,73	122,20	117,12	116,37	112,15	114,29	109,79

4.2.1.2. Đánh giá hình thái và quang học của điện cực biến tính phát hiện protein BSA-FITC

Hình 4.16 mô tả các khảo sát bề mặt điện cực vàng SPAuE trần. Hình 4.16a trình bày ảnh chụp từ trên xuống của điện cực SPAuE, cho thấy hệ ba điện cực tích hợp bao gồm điện cực làm việc bằng vàng, điện cực so sánh Ag/AgCl và điện cực đối cacbon. Ảnh phóng to vùng điện cực được thể hiện trong Hình 4.16b, làm nổi bật bố cục nhỏ gọn, phù hợp cho các phép đo điện hóa trong thể tích nhỏ. Phân tích SEM của điện cực làm việc trên Hình 4.16c cho thấy cấu trúc vàng ở kích thước micromet không có dấu hiệu nhiễm bẩn hoặc tích tụ vật chất sinh học. Phổ EDX tương ứng trên Hình 4.16d cho thấy thành phần vàng (Au) đạt 100% trên bề mặt điện cực làm việc. Kết quả cho thấy bề mặt sạch, chưa được biến tính trước khi

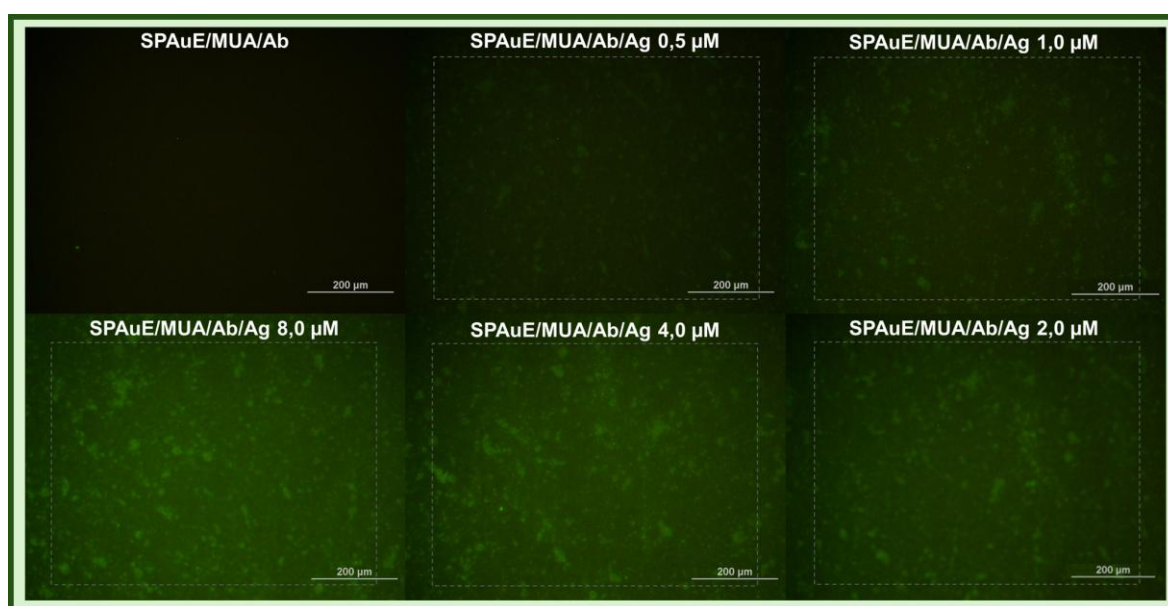
chức năng hóa. Các kết quả này cho thấy cấu trúc điện cực SPAuE là nền tảng phù hợp để đánh giá các đặc tính điện hóa của bề mặt điện cực sau khi được biến tính trong ứng dụng cảm biến sinh học [124], [125].



Hình 4.16. Khảo sát điện cực vàng SPAuE trần: (a) Cấu trúc và (b) Ảnh hiển vi cấu trúc ba điện cực; (c) Ảnh SEM và (d) Phổ EDX bề mặt điện cực làm việc (Au).

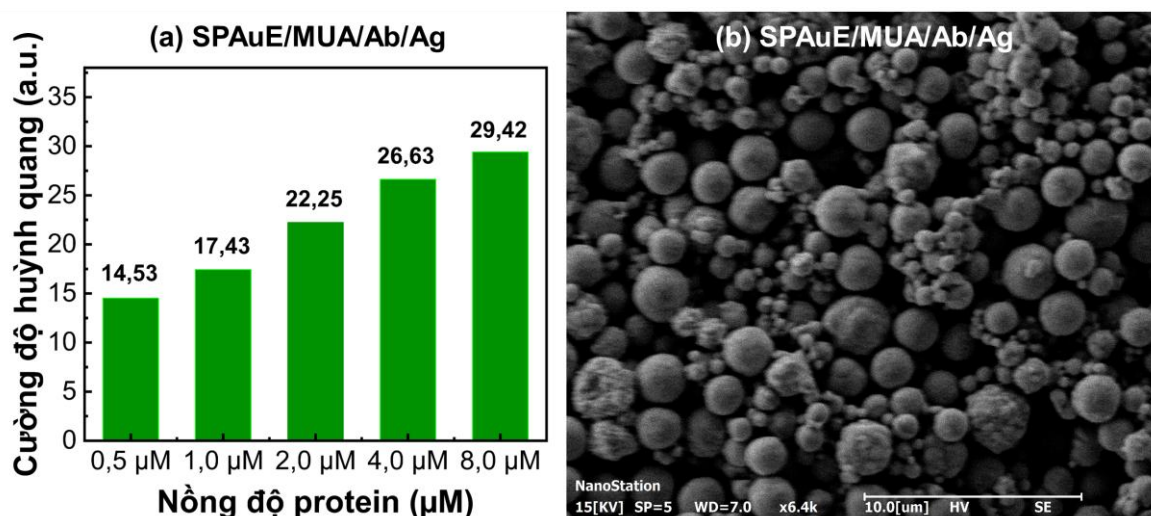
Sau quy trình chức năng hoá điện cực gắn kháng thể anti-BSA và bắt giữ kháng nguyên BSA-FITC, điện cực được soi dưới kính hiển vi để quan sát tín hiệu huỳnh quang của BSA trên bề mặt điện cực. Hình 4.17 cung cấp ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC (Ag) ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM , được bắt giữ trên bề mặt điện cực đã cố định kháng thể anti-BSA (Ab). Các khung chữ nhật nét đứt trong ảnh biểu thị vùng ROI (Region of Interest) cố định, được sử dụng để định lượng cường độ huỳnh quang. Quan sát cho thấy cường độ huỳnh quang tăng dần khi nồng độ BSA-FITC tăng, phản ánh sự bắt giữ protein hiệu quả trên bề mặt điện

cực đã được chức năng hóa. Mẫu đối chứng chỉ cố định kháng thể (SPAuE/MUA/Ab) cho nền huỳnh quang rất thấp, chứng tỏ tín hiệu huỳnh quang thu được có tính đặc hiệu cao, xuất phát từ sự gắn kết chọn lọc giữa kháng thể và kháng nguyên. Giá trị xám trung bình được trích xuất từ vùng ROI cố định (khoảng 6,4 triệu điểm ảnh) tăng tương ứng với nồng độ BSA-FITC, thể hiện mối quan hệ đồng biến giữa tín hiệu quang học và lượng protein gắn kết trên bề mặt điện cực.



Hình 4.17. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC (Ag) ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM được bắt giữ trên bề mặt điện cực đã cố định kháng thể anti-BSA (Ab). Các khung chữ nhật nét đứt biểu thị vùng ROI cố định để thực hiện định lượng cường độ huỳnh quang.

Hình 4.18 cung cấp đánh giá huỳnh quang và hình thái bề mặt của điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC. Hình 4.18a cho thấy cường độ huỳnh quang tăng dần từ 14,53 đến 29,42 theo nồng độ BSA-FITC tăng từ 0,5 đến 8,0 μM . Hình 4.18b là ảnh SEM của điện cực SPAuE sau khi hình thành SAM MUA, cố định kháng thể anti-BSA và bắt giữ protein BSA-FITC ở nồng độ 5,0 μM để đánh giá sự thay đổi hình thái bề mặt. So với điện cực trần, bề mặt điện cực sau khi bắt giữ protein cho thấy sự thay đổi về hình thái, thể hiện qua sự xuất hiện của các vùng kết tụ nhỏ không đồng nhất và độ gồ ghề tăng nhẹ, phản ánh sự hình thành lớp SAM và quá trình gắn kết sinh học.



Hình 4.18. Đánh giá huỳnh quang và hình thái bề mặt của điện cực sau khi gắn BSA-FITC: (a) Cường độ huỳnh quang của protein BSA-FITC ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM; (b) Ảnh SEM của điện cực sau khi bắt giữ protein BSA-FITC ở nồng độ 5,0 μM.

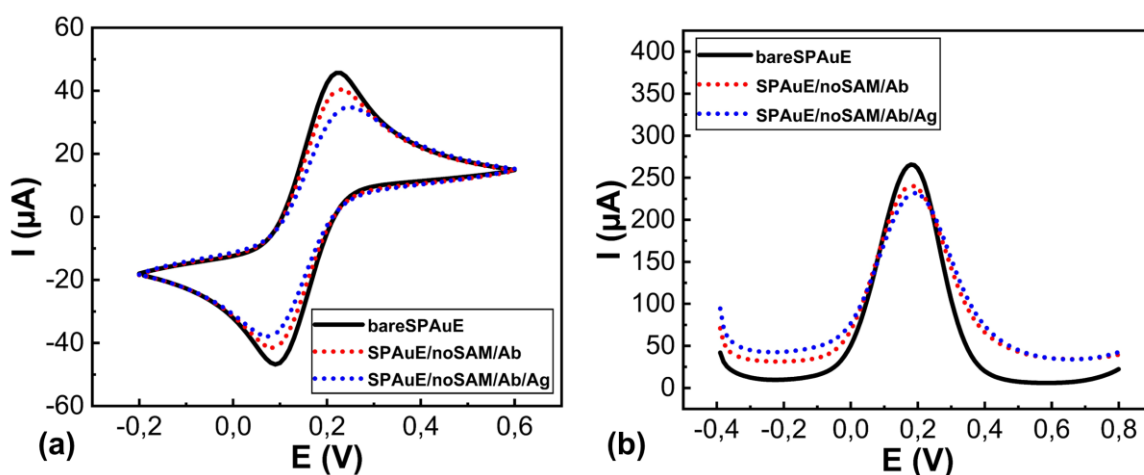
Các kết tụ có kích thước không đều và phân bố rõ rệt hơn được quan sát trên điện cực được biến tính bằng SAM L-Cysteine, như thể hiện trên Hình P1.8 ở Phụ lục P1.2. Những đặc điểm hình thái này, được ghi nhận qua ảnh SEM, phù hợp với các nghiên cứu trước đây về sự thay đổi cấu trúc bề mặt của điện cực vàng sau khi phủ các hợp chất chứa nhóm thiol [126]–[128]. Kết quả quan sát cũng thống nhất với phân tích huỳnh quang, khẳng định rằng quá trình chức năng hóa bề mặt đã được thực hiện hiệu quả, cho phép bắt giữ đặc hiệu protein BSA-FITC trên bề mặt điện cực.

4.2.1.3. Kết quả khảo sát tín hiệu điện hoá quy trình biến tính điện cực vàng phát hiện protein BSA

Để khẳng định vai trò thiết yếu của lớp SAM trong việc cố định kháng thể và bắt giữ kháng nguyên một cách hiệu quả, các điện cực đối chứng không biến tính bằng SAM đã được khảo sát. Các phép đo điện hóa được tiến hành nhằm kiểm chứng các quan sát huỳnh quang và cung cấp thêm bằng chứng về sự thay đổi tại bề mặt điện cực sau các bước biến tính.

a. Kết quả trên điện cực đối chứng không phủ SAM

Hình 4.19 trình bày đặc trưng điện hóa của các điện cực đối chứng không có biến tính SAM, được đánh giá bằng hai kỹ thuật CV và SWV. Quan sát ở Hình 4.19a cho thấy các đường cong CV của điện cực trần, điện cực sau khi cố định kháng thể, và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC gần như trùng nhau, chỉ có sự thay đổi rất nhỏ về cường độ dòng đỉnh và thế đỉnh. Tương tự, trên Hình 4.19b, phổ SWV của các điện cực cũng thể hiện tín hiệu dòng tương đối ổn định, không có sự giảm đáng kể nào phản ánh sự cản trở truyền điện tích. Điều này chứng tỏ rằng, khi không có lớp SAM để hỗ trợ cố định sinh học, các phân tử kháng thể và kháng nguyên chỉ hấp phụ yếu và không tạo thành lớp chức năng bền vững trên bề mặt vàng. Sự thiếu hụt lớp trung gian này dẫn đến tương tác sinh học kém hiệu quả và tín hiệu điện hóa không thể hiện rõ ràng sự thay đổi sau mỗi giai đoạn chức năng hóa. Do đó, kết quả từ CV và SWV khẳng định vai trò quan trọng của lớp SAM trong việc tạo liên kết hóa học ổn định giữa kháng thể và bề mặt điện cực, từ đó cải thiện tính nhạy và độ đặc hiệu của cảm biến.

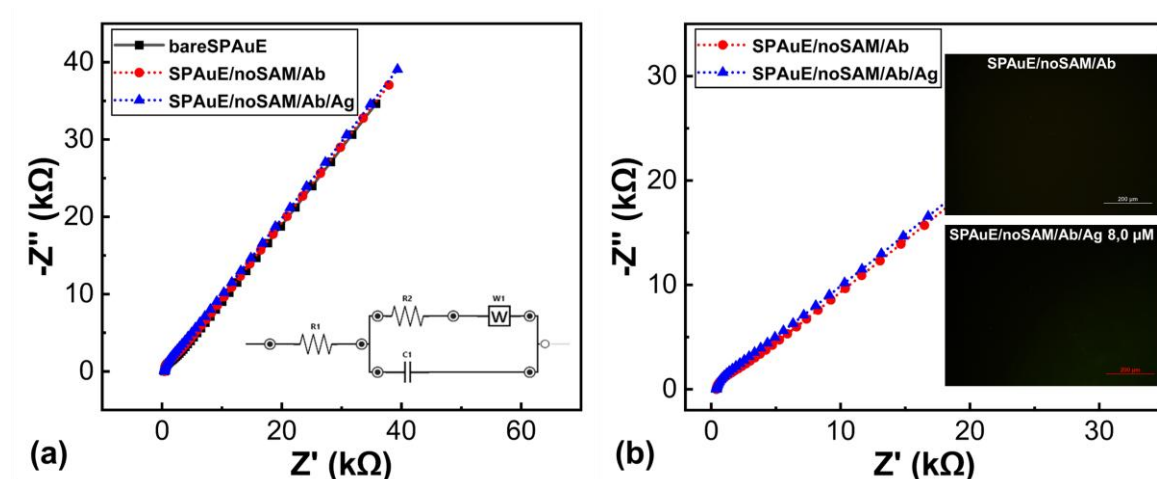


Hình 4.19. Đáp ứng điện hóa của các điện cực đối chứng không có SAM: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực trần, điện cực cố định kháng thể và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC.

Hình 4.20 cung cấp bằng chứng bổ sung về đáp ứng điện hóa và quang học của các điện cực đối chứng không có lớp SAM. Trên Hình 4.20a, đồ thị Nyquist cho thấy điện trở truyền điện tích R_{CT} chỉ tăng nhẹ từ 1,37 k Ω (điện cực trần) lên 1,38

$k\Omega$ (sau khi cố định kháng thể) và $1,48 k\Omega$ (sau khi bắt giữ BSA-FITC). Sự thay đổi rất nhỏ này cho thấy quá trình gắn kết sinh học gần như không ảnh hưởng đáng kể đến trở kháng bề mặt, phản ánh hiệu quả cố định và phát hiện kháng nguyên thấp.

Hình 4.20b phóng to tín hiệu EIS cho thấy trở kháng gần như không thay đổi đáng kể trước và sau khi bắt giữ BSA-FITC và tiếp tục củng cố nhận định trên thông qua ảnh huỳnh quang chèn, trong đó bề mặt điện cực chỉ cố định kháng thể (hình chèn trên) và sau khi ủ với $8,0 \mu M$ BSA-FITC (hình chèn dưới) đều không xuất hiện tín hiệu huỳnh quang đáng kể. Kết quả này chứng minh rằng, khi không có lớp SAM làm lớp neo trung gian, các phân tử protein không thể gắn kết bền vững trên bề mặt vàng, dẫn đến tín hiệu điện hóa và quang học rất yếu.

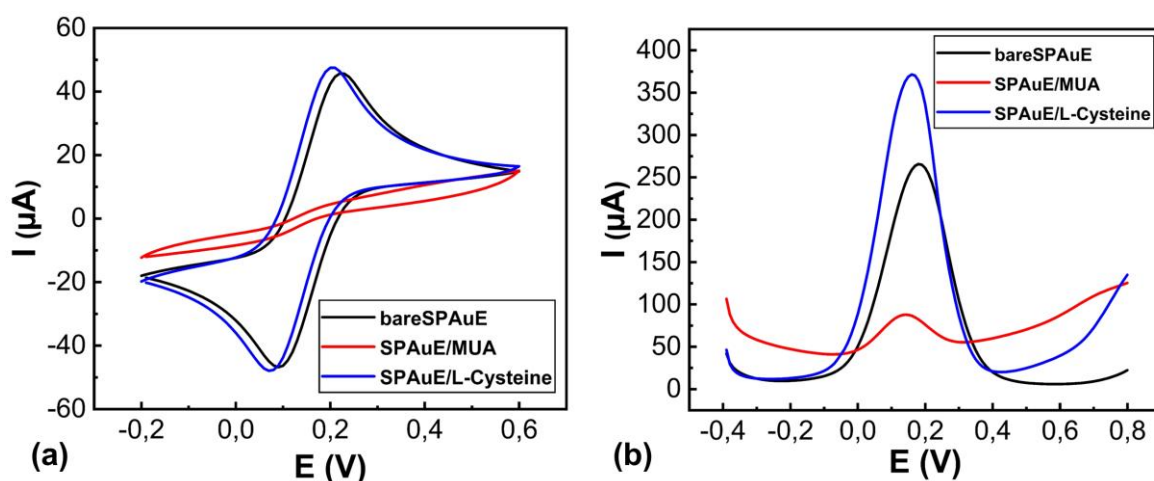


Hình 4.20. Phổ EIS và xác nhận huỳnh quang của các điện cực đối chứng không có SAM: (a) Đồ thị Nyquist của điện cực trần, điện cực cố định kháng thể và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC $8,0 \mu M$ (Hình chèn: mạch tương đương Randles); (b) So sánh trở kháng giữa điện cực cố định kháng thể và điện cực bắt giữ BSA-FITC. (Hình chèn: ảnh huỳnh quang của các điện cực đối chứng không có SAM: điện cực cố định kháng thể (trên) và điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC $8,0 \mu M$ (dưới)).

Tổng hợp lại, những kết quả này khẳng định rằng lớp SAM đóng vai trò thiết yếu trong việc hình thành cầu nối hóa học ổn định giữa điện cực và thành phần sinh học, giúp tăng cường khả năng bắt giữ kháng nguyên và cải thiện đáng kể hiệu quả phát hiện sinh học của cảm biến điện hóa.

b. Kết quả điện hóa của quá trình biến tính điện cực phủ SAM

Hình 4.21 trình bày các đáp ứng điện hóa CV và SWV của điện cực SPAuE trước và sau khi hình thành lớp SAM MUA và L-Cysteine. Đối với điện cực biến tính bằng MUA, dòng đỉnh anốt giảm đáng kể, phản ánh sự gia tăng trở kháng truyền điện tích tại bề mặt giao diện sau khi hình thành lớp SAM. Cụ thể, trên đường cong CV (Hình 4.21a), dòng đỉnh anốt giảm xuống còn 3,81 μA tại 0,20 V, so với điện cực trần là 52,62 μA tại 0,22 V. Phân tích SWV (Hình 4.21b) cho thấy xu hướng tương tự, với dòng đỉnh chỉ 39,06 μA tại 0,14 V, thấp hơn nhiều so với điện cực trần 257,90 μA tại 0,18 V. Sự suy giảm này phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các lớp đơn MUA dày và đồng nhất cản trở mạnh quá trình trao đổi electron, tạo ra tín hiệu điện hóa đặc trưng và đáng tin cậy của bề mặt vàng được phủ thành công [129].



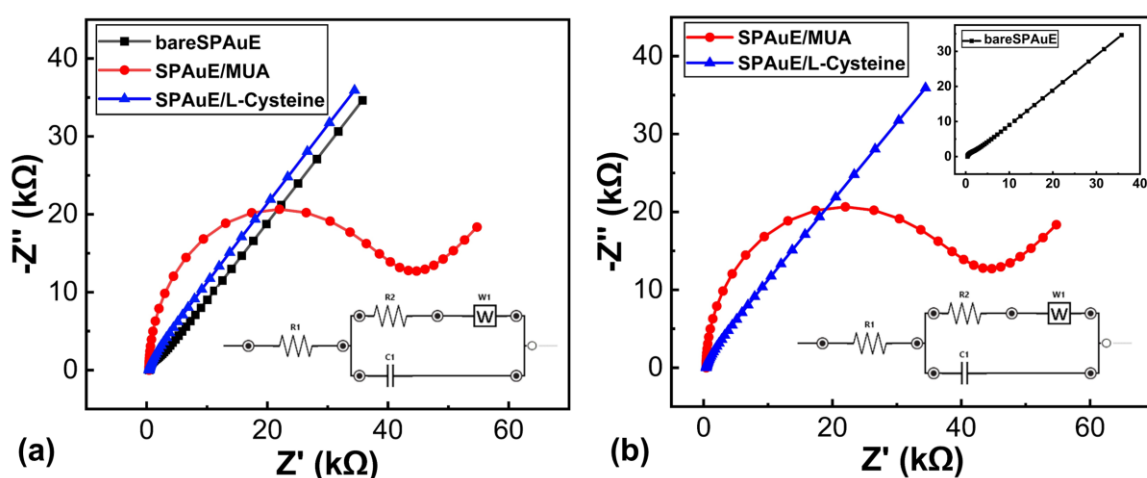
Hình 4.21. Đáp ứng điện hóa của các điện cực được biến tính bởi SAM: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực trần, điện cực được biến tính bởi MUA và L-Cysteine.

Ngược lại, các điện cực được biến tính bằng L-Cysteine thể hiện khả năng trao đổi electron vượt trội hơn cả điện cực trần và điện cực phủ MUA. Cụ thể, dòng đỉnh anốt đạt 53,63 μA tại 0,20 V, cao hơn một chút so với điện cực trần (52,62 μA tại 0,22 V) và cao hơn đáng kể so với điện cực phủ MUA (3,81 μA tại 0,20 V). Phổ SWV cũng thể hiện đỉnh rõ và cao, đạt 354,70 μA ở 0,16 V, vượt xa các giá trị của MUA và điện cực trần. Kết quả này cho thấy rằng lớp SAM từ L-Cysteine không

cản trở mà thậm chí còn tăng cường hiệu quả truyền điện tích tại bề mặt điện cực, nhờ cấu trúc phân tử ngắn và nhóm chức phân cực của L-Cysteine cho phép tương tác điện tử nhanh hơn.

Hình 4.22 thể hiện phổ EIS của các điện cực trần và điện cực được biến tính bằng MUA và L-Cysteine. Trên đồ thị Nyquist (Hình 4.22a), điện cực trần thể hiện một hình bán nguyệt nhỏ tương ứng với điện trở truyền điện tích $R_{CT} = 1,37 \text{ k}\Omega$. Trong khi đó, lớp SAM MUA thể hiện bán nguyệt mở rộng đáng kể, tương ứng với R_{CT} tăng lên $38,50 \text{ k}\Omega$, cho thấy tính cản trở truyền điện tích rõ rệt.

Ngược lại, điện cực phủ L-Cysteine thể hiện đặc tính ngược lại, với phổ gần như tuyến tính và R_{CT} rất thấp, chỉ khoảng $0,09 \Omega$, phản ánh khả năng truyền điện tích nhanh tại giao diện điện cực – dung dịch điện ly. Đặc tính này đặc biệt có lợi trong phát triển cảm biến miễn dịch, khi điện trở truyền điện tích thường tăng lên sau khi cố định kháng thể và bắt giữ kháng nguyên [130].



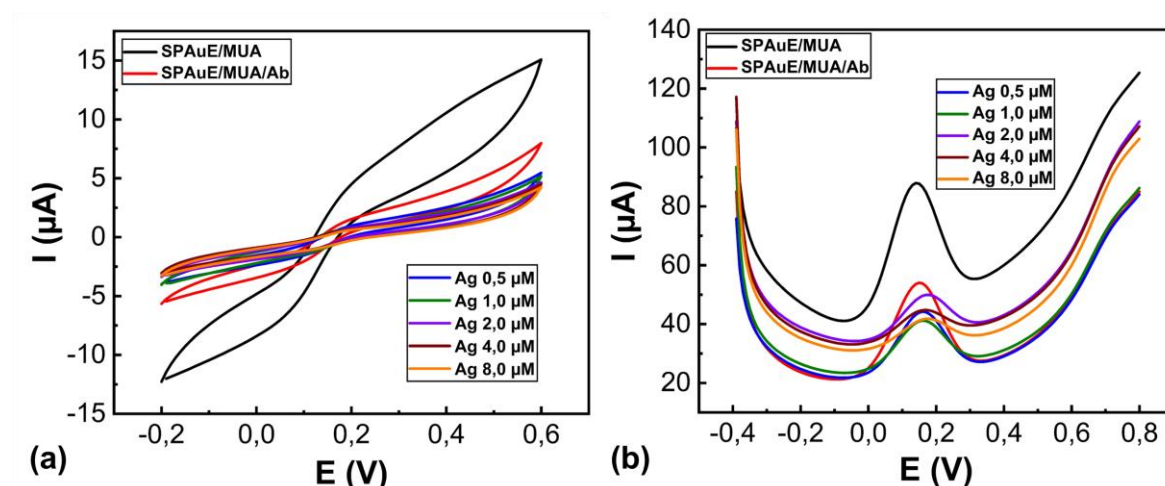
Hình 4.22. Phổ EIS của các điện cực được biến tính bởi SAM: (a) Đồ thị Nyquist của điện cực trần, điện cực được biến tính bởi MUA và L-Cysteine (b) So sánh trở kháng giữa SAM MUA và L-Cysteine. (Hình chèn: đồ thị Nyquist của SPAuE trần).

Hình 4.22b cung cấp sự so sánh trực quan giữa phổ EIS của hai điện cực có lớp SAM khác nhau. Trong khi điện cực phủ L-Cysteine có đặc tính phổ EIS gần như tuyến tính đặc trưng của trở kháng thấp, điện cực phủ MUA thể hiện bán nguyệt lớn, đặc trưng cho quá trình truyền điện tích bị cản trở mạnh. Phân tích

mạch tương đương Randles cho thấy sự khác biệt chính này chủ yếu đến từ giá trị R_{CT} , phản ánh đặc điểm dẫn truyền khác nhau giữa hai loại lớp SAM.

Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi cấu trúc phân tử đặc trưng của từng hợp chất: L-Cysteine, với chuỗi ngắn và nhóm chức lưỡng cực, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình trao đổi electron. MUA, với chuỗi ankyl dài hơn, hình thành lớp đơn dày và chặt, gây cản trở mạnh quá trình truyền điện tích [131], [132]. Mỗi loại SAM vì thế mang lại lợi thế riêng, tùy thuộc vào ứng dụng cụ thể trong phát triển cảm biến sinh học điện hóa.

c. Kết quả điện hóa của quá trình cố định kháng thể, phát hiện kháng nguyên



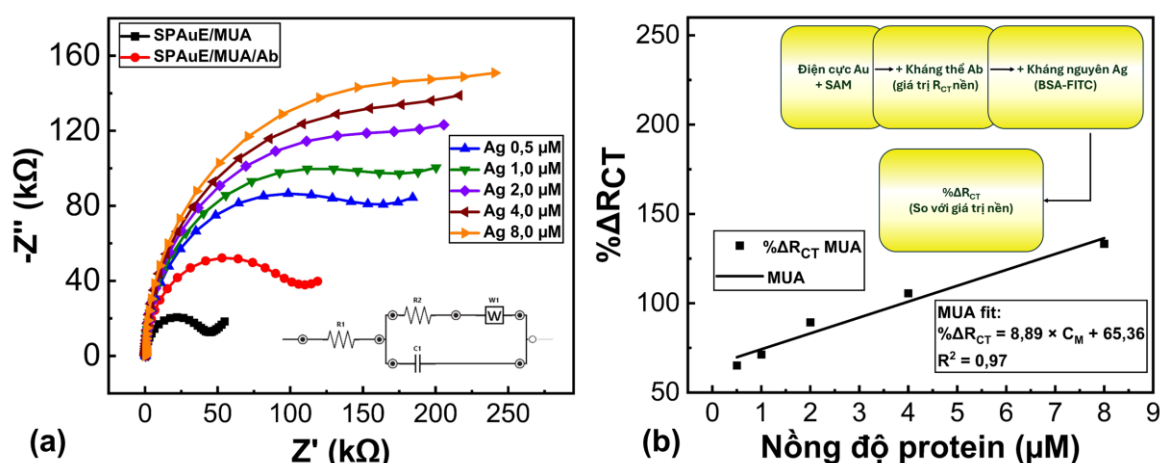
Hình 4.23. Đáp ứng điện hóa của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM).

Hình 4.23 thể hiện đáp ứng điện hóa CV và SWV của điện cực được biến tính bằng MUA trong quá trình hình thành SAM, cố định kháng thể và phát hiện protein BSA-FITC ở các nồng độ từ 0,5–8,0 μM . Cả hai phép đo đều cho thấy sự dịch chuyển dương của thế oxy hóa sau khi gắn kháng nguyên và khi nồng độ kháng nguyên tăng, phản ánh sự hình thành của phức hợp kháng nguyên–kháng thể trên bề mặt điện cực, tạo nên lớp cản trở truyền điện tích [133], [134]. Do đó, thế oxy hóa cần cao hơn để duy trì phản ứng oxy hóa–khử, dẫn đến sự dịch chuyển đỉnh thế quan

sát được đặc trưng cho cơ chế cản trở truyền điện tích khi xảy ra gắn kết sinh học (Hình 4.23a) [135].

Tín hiệu SWV trong Hình 4.23b xác nhận rõ xu hướng này, với dòng đỉnh giảm dần theo từng bước biến tính: từ 39,06 μA sau khi hình thành SAM, xuống 29,22 μA sau khi cố định kháng thể, và giảm còn 7,70 μA khi bắt giữ BSA-FITC 8,0 μM . Kết quả này chứng tỏ rằng lớp SAM MUA hoạt động hiệu quả như một nền liên kết bền vững cho kháng thể, đồng thời tạo ra tín hiệu điện hóa giảm dần đặc trưng cho quá trình bắt giữ kháng nguyên thành công.

Hình 4.24 trình bày đáp ứng EIS của điện cực SPAuE được biến tính bằng SAM MUA trong quá trình phát hiện protein BSA-FITC ở dải nồng độ 0,5–8,0 μM . Như thể hiện trong Hình 4.24a, đường kính bán nguyệt của đồ thị Nyquist tăng dần khi nồng độ BSA-FITC tăng, phản ánh sự gia tăng điện trở truyền điện tích R_{CT} do sự hình thành phức hợp kháng nguyên–kháng thể trên bề mặt điện cực [136], [137]. Sự thay đổi này cho thấy lớp SAM MUA hoạt động như một lớp cách điện, làm cản trở quá trình truyền điện tích, đồng thời cho phép ghi nhận sự thay đổi tín hiệu rõ rệt khi protein được bắt giữ.



Hình 4.24. (a) Phổ EIS quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM); (b) Đồ thị hiệu chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của $\% \Delta R_{CT}$ vào nồng độ BSA-FITC (Hình chèn: sơ đồ minh họa phép đo $\% \Delta R_{CT}$ so với giá trị nền sau khi gắn kháng thể).

Kết quả khớp mạch tương đương Randles bằng phần mềm PS Trace 5.9 cho thấy các giá trị Chi-squared (χ^2) nằm trong khoảng 0,0806–0,0884, chứng tỏ mô hình Randles mô phỏng tốt dữ liệu thực nghiệm. Mối quan hệ giữa $\% \Delta R_{CT}$ và nồng độ BSA-FITC (C_M) được thể hiện trong Hình 4.24b, cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính trong toàn dải khảo sát, được mô tả bởi phương trình hồi quy:

$$\% \Delta R_{CT} = 8,89 \times C_M + 65,36 \quad (R^2 = 0,97) \quad (4.1)$$

Độ dốc của đường hồi quy thể hiện độ nhạy của cảm biến đạt 8,89 $\% \Delta R_{CT}/\mu M$, với giới hạn phát hiện (LOD) 0,16 μM .

Các kết quả này cho thấy SAM MUA hình thành lớp phủ bền vững, cho phép theo dõi hiệu quả sự gắn kết sinh học thông qua biến thiên trở kháng, đồng thời khẳng định vai trò của lớp SAM trong việc tạo nên tầng ổn định cho quá trình cố định kháng thể và phát hiện protein đặc hiệu. Đây cũng là cơ sở để thực hiện các quy trình biến tính điện cực cho phép phát hiện protein VP28 ở nồng độ thấp trong quy trình tiếp theo.

4.2.1.4. Kết luận

Nghiên cứu về quá trình chức năng hóa điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC đã làm sáng tỏ vai trò quan trọng của các lớp đơn tự sắp xếp SAM trong việc hình thành nền tảng cảm biến sinh học ổn định và đặc hiệu. Các thí nghiệm đối chứng cho thấy, trong điều kiện không có SAM, việc cố định kháng thể diễn ra kém hiệu quả, dẫn đến khả năng bắt giữ kháng nguyên thấp và tín hiệu điện hóa yếu, thiếu đặc hiệu. Ngược lại, các điện cực được phủ SAM thể hiện rõ sự thay đổi tín hiệu phụ thuộc nồng độ trên tất cả các kỹ thuật đo (CV, SWV, và EIS), minh chứng cho vai trò trung gian không thể thiếu của lớp SAM trong quá trình nhận biết sinh học và truyền tín hiệu điện hóa.

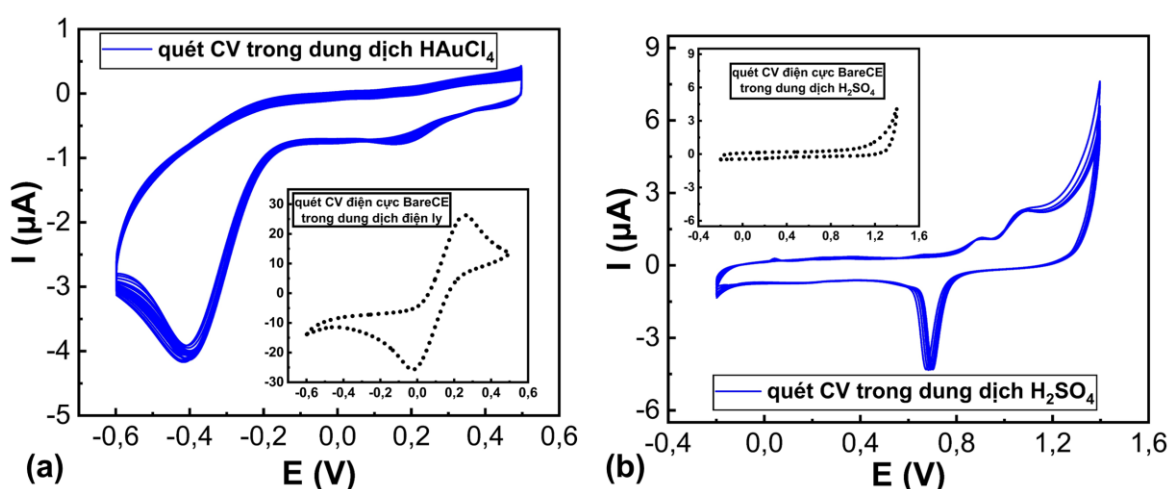
Cả hai loại SAM được khảo sát, MUA và L-Cysteine (L-Cysteine trình bày ở Phụ lục 1), đều hỗ trợ hiệu quả quá trình cố định kháng thể và phát hiện kháng nguyên BSA-FITC trong dải nồng độ 0,5–8,0 μM . Tuy nhiên, mỗi loại SAM thể hiện các đặc tính điện hóa khác biệt: SAM MUA hình thành lớp phủ dày đặc, có

điện trở truyền điện tích lớn $R_{CT} = 38,5 \text{ k}\Omega$, mang lại độ ổn định và khả năng chặn bề mặt tốt; trong khi đó, SAM L-Cysteine cho phép truyền điện tích nhanh. Sự khác biệt này phản ánh ảnh hưởng của cấu trúc phân tử và đặc tính hóa học của từng hợp chất thiol lên khả năng truyền điện tử và tương tác sinh học.

Những kết quả thu được không chỉ xác nhận thành công của quy trình chức năng hóa bề mặt điện cực vàng bằng các hợp chất chứa nhóm thiol, mà còn cung cấp cơ sở khoa học và thực nghiệm vững chắc cho việc lựa chọn và tối ưu hóa thành phần SAM trong các cảm biến miễn dịch điện hóa sau này. Quy trình này đồng thời đóng vai trò nền tảng cho giai đoạn tiếp theo, phát triển quy trình chức năng hóa điện cực phát hiện protein VP28 – chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên tôm nuôi.

4.2.2. Kết quả phát hiện protein VP28 với hệ đo thương mại

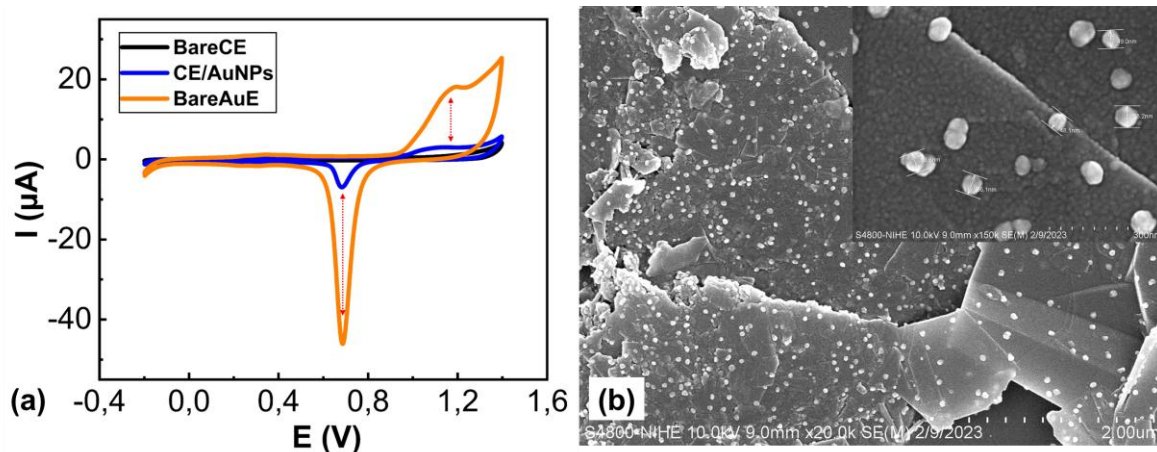
4.2.2.1. Khảo sát quy trình biến tính cảm biến miễn dịch



Hình 4.25. Quá trình phủ AuNPs: (a) Quét 20 vòng CV trên điện cực BareCE trong dung dịch HAuCl_4 165 μM từ $-0,6 \text{ V}$ đến $+0,5 \text{ V}$ (Hình chèn: quét CV điện cực BareCE trong dung dịch điện ly cùng dải và tốc độ quét); (b) Quét 7 vòng CV trên điện cực CE/AuNPs trong dung dịch H_2SO_4 1 M từ $-0,2 \text{ V}$ đến $+1,4 \text{ V}$, ở tốc độ quét 50 mV/s (Hình chèn: quét CV điện cực BareCE trong dung dịch H_2SO_4 cùng dải và tốc độ quét).

Hình 4.25a minh họa quá trình quét 20 vòng CV trên điện cực SPCE trần (BareCE) trong dung dịch HAuCl_4 165 μM từ $-0,6 \text{ V}$ đến $+0,5 \text{ V}$ ở tốc độ quét 50

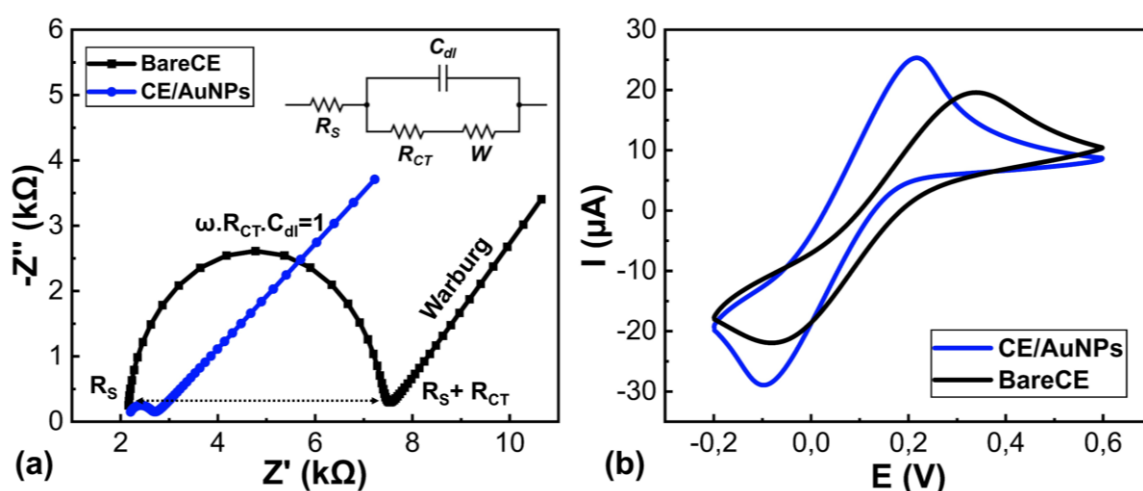
mV/s. Trên đường dòng điện thế có đỉnh khử từ Au^{3+} về Au^0 ở điện thế xấp xỉ $-0,4$ V (so với Ag/AgCl) theo phương trình (2.3) biểu thị phản ứng lắng đọng tổng thể của hạt vàng trên điện cực cacbon [138]. Hình chèn trong Hình 4.25a mô tả đồ thị CV của điện cực BareCE quét trong dung dịch điện ly (đường chấm đen), cho thấy xuất hiện đỉnh oxy hóa–khử đặc trưng. Hình 4.25b biểu diễn quá trình quét 7 vòng CV trên CE/AuNPs trong dung dịch H_2SO_4 1M từ $-0,2$ V đến $+1,4$ V, ở tốc độ quét 50 mV/s. Đỉnh oxy hóa ở $+1,1$ V và đỉnh khử ở $+0,7$ V trên đồ thị dòng điện tương ứng với sự hình thành vàng hydroxit từ vàng trong môi trường axit, cũng như sự khử các oxit vàng và hydroxit vàng hình thành trước đó trở lại vàng [97], [139], [140]. Hình chèn trong Hình 4.25b mô tả đồ thị CV của điện cực BareCE quét trong cùng dung dịch H_2SO_4 (đường chấm đen), cho thấy không xuất hiện đỉnh oxy hóa–khử. Kết quả này cho thấy sự tổng hợp thành công các hạt vàng bằng kỹ thuật quét CV. Ngoài ra, bước này có hiệu quả trong việc làm sạch bề mặt các hạt vàng được lắng đọng, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho các bước tiếp theo trong quy trình phát triển cảm biến miễn dịch.



Hình 4.26. (a) Đồ thị CV quét trên BareCE và CE/AuNPs và BareAuE trong dung dịch H_2SO_4 1 M từ $-0,2$ V đến $+1,4$ V, ở tốc độ quét 50 mV/s; (b) Ảnh SEM của AuNPs trên CE/AuNPs (Hình chèn: Ảnh SEM phóng đại các hạt vàng có đường kính từ 48 đến 58 nm).

Hình 4.26a cho thấy các đồ thị CV được quét trên các điện cực cacbon SPCE trần (BareCE), SPCE đã phủ vàng (CE/AuNPs) và vàng SPAuE trần (BareAuE) trong dung dịch H_2SO_4 1 M từ $-0,2$ V đến $+1,4$ V, ở tốc độ quét 50 mV/s. Rõ ràng

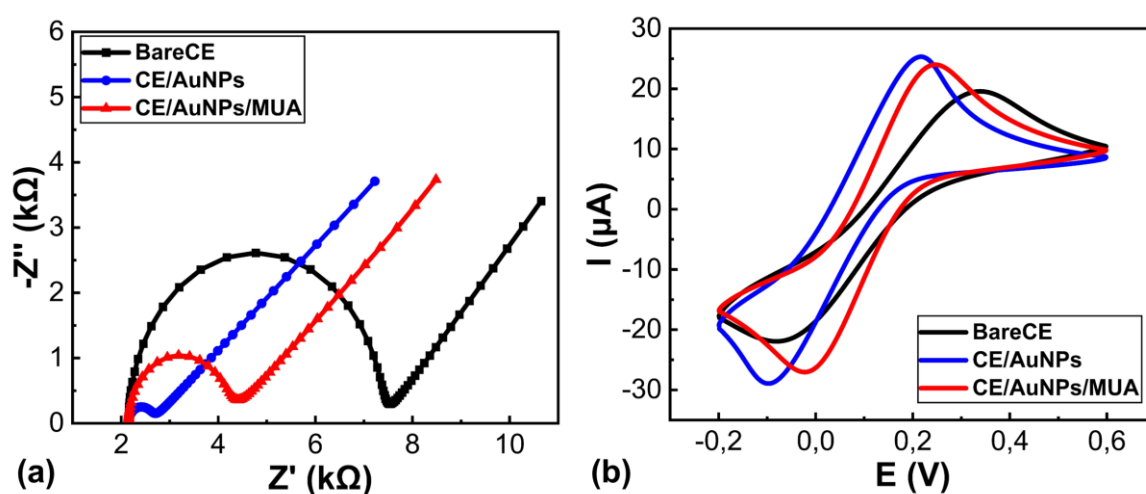
là điện cực cacbon trần (BareCE) không biểu hiện các đỉnh oxy hóa cũng như đỉnh khử trên đồ thị CV (đường màu đen). Trong khi đó, vị trí của các đỉnh oxy hóa và khử trên điện cực cacbon phủ AuNPs (CE/AuNPs) tương ứng với vị trí đỉnh trên điện cực vàng trần (BareAuE). Hình 4.26b cho thấy ảnh SEM mô tả AuNPs trên CE/AuNPs. Kết quả trực quan này chứng minh rằng quá trình phủ các hạt nano vàng bằng kỹ thuật quét thể tuần hoàn phân tán đồng đều các hạt vàng có kích thước nano (AuNPs) với đường kính nằm trong khoảng từ 48 đến 58 nm như được minh họa bằng các chấm trắng trong ảnh SEM. Tín hiệu CV trên Hình 4.25 và Hình 4.26a kết hợp với ảnh SEM trên Hình 4.26b, cho thấy AuNPs đã được lắng đọng và làm sạch trên bề mặt điện cực cacbon. Bề mặt AuNPs này đóng vai trò là nền tảng để hình thành SAM, cố định các kháng thể, cho phép liên kết có chọn lọc với các loại protein mục tiêu [141].



Hình 4.27. (a) Đồ thị Nyquist (Hình chèn: Mạch tương đương Randles) và (b) Đồ thị CV của điện cực BareCE và CE/AuNPs trong dung dịch điện ly ở tốc độ quét 50 mV/s với điện cực so sánh Ag/AgCl.

Sau quá trình phủ vàng, điện cực CE/AuNPs được so sánh với các đặc tính điện hóa của điện cực cacbon trần ban đầu (bareCE). Kết quả so sánh được thể hiện ở Hình 4.27. Hình 4.27a cho thấy sự thay đổi trong đồ thị EIS của điện cực cảm biến sau khi lắng đọng AuNPs, được ghi lại ở điện áp xoay chiều có biên độ 10 mV và dải tần thay đổi từ 10^5 Hz đến 0,01 Hz trong dung dịch điện ly. Giao diện điện cực và dung dịch điện ly được mô tả bằng mạch tương đương Randles, bao gồm

điện trở của dung dịch R_s , điện dung lớp kép C_{dl} , điện trở chuyển điện tích R_{CT} và điện trở Warburg W (hình chèn trong Hình 4.27a). Khi bề mặt điện cực được chức năng hóa tiếp xúc với dung dịch điện ly, phản ứng oxy hóa khử sẽ tạo ra các electron và tạo điều kiện cho chúng di chuyển trên bề mặt điện cực. Do đó, R_{CT} có liên quan đến quá trình truyền điện tích, cung cấp tín hiệu quan trọng liên quan đến hình thái và độ dẫn điện của bề mặt điện cực. R_{CT} của điện cực bareCE ban đầu cao ở mức 5,2 k Ω sau đó giảm mạnh xuống 0,5 k Ω , xấp xỉ 93,2% sau bước phủ vàng. Đồ thị CV trong Hình 4.27b cho thấy sự dịch chuyển của các đỉnh oxy hoá khử dòng điện, minh chứng cho sự biến đổi trên bề mặt điện cực. Ngoài ra, các đỉnh dòng điện tăng và nhọn hơn cho thấy điện cực sau khi phủ vàng, thể hiện độ truyền điện tích cũng như tốc độ phản ứng oxy hoá khử được cải thiện. Điện trở giảm đáng kể, phù hợp với sự gia tăng dòng điện cực đại thể hiện rõ sự hình thành cấu trúc AuNPs trên bề mặt điện cực. Lớp AuNPs này giúp tăng cường độ nhạy của cảm biến và khả năng cố định SAM.

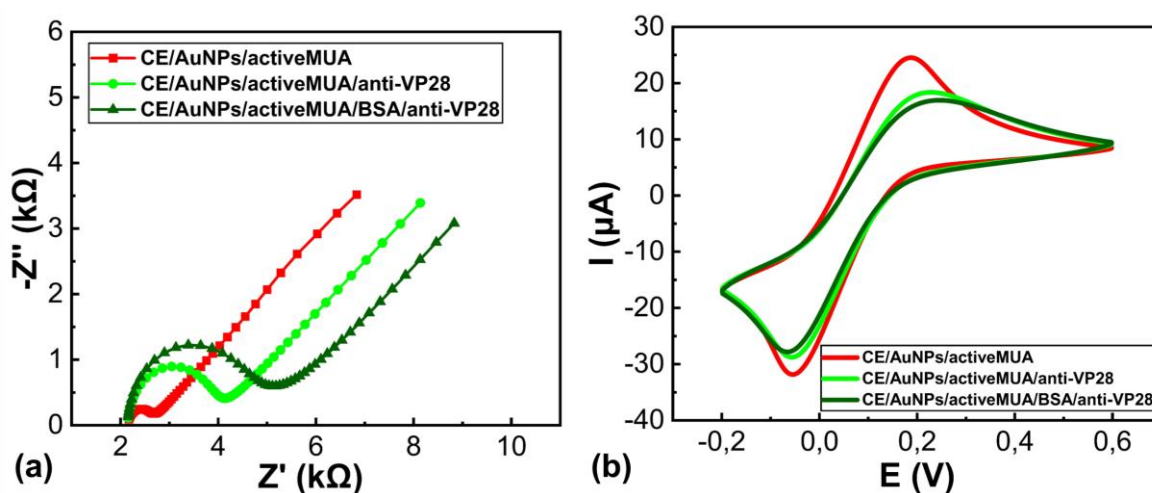


Hình 4.28. (a) Đồ thị Nyquist và (b) Đồ thị CV thay đổi sau khi phủ AuNPs và hình thành SAM.

Tiếp theo đó, sự hình thành SAM trên bề mặt điện cực được chứng minh bằng sự gia tăng đáng kể giá trị R_{CT} , đạt tới 2,0 k Ω . Kết quả này được thể hiện rõ ràng trong Hình 4.28a, đường kính của hình bán nguyệt màu đỏ (CE/AuNPs/MUA) tăng đáng kể so với đường kính của hình bán nguyệt màu xanh (CE/AuNPs). Đồng

thời, việc giảm và dịch chuyển dòng điện cực đại trong Hình 4.28b phù hợp với tính nhất quán quan sát được trong các kết quả thực nghiệm và chứng thực các phát hiện của nghiên cứu trước đó [54], [142], đã chỉ ra rằng quá trình hình thành SAM MUA được đặc trưng bởi sự tăng trở kháng.

Hình 4.29 cho thấy sự thay đổi trong đồ thị EIS và CV của điện cực cảm biến trong mỗi bước sửa đổi. Hình 4.29a mô tả đồ thị Nyquist của các phép đo trở kháng được thực hiện trong quá trình biến tính từng bước để cố định đầu thu sinh học ở nồng độ 150 $\mu\text{g/mL}$, bao gồm kích hoạt SAM, cố định kháng thể anti-VP28 và chặn liên kết không đặc hiệu (sử dụng BSA 1%). Kết quả thí nghiệm cho thấy giá trị R_{CT} tăng lần lượt từ 0,4 $k\Omega$ lên 1,6 $k\Omega$ và sau đó lên 1,9 $k\Omega$ tương ứng với ba bước nói trên. Sự thay đổi đáng kể này về điện trở truyền điện tích, cùng với những biến đổi trong tín hiệu CV trong Hình 4.29b, xác nhận sự liên kết thành công của kháng thể anti-VP28 với SAM được chức năng hóa trên bề mặt điện cực.

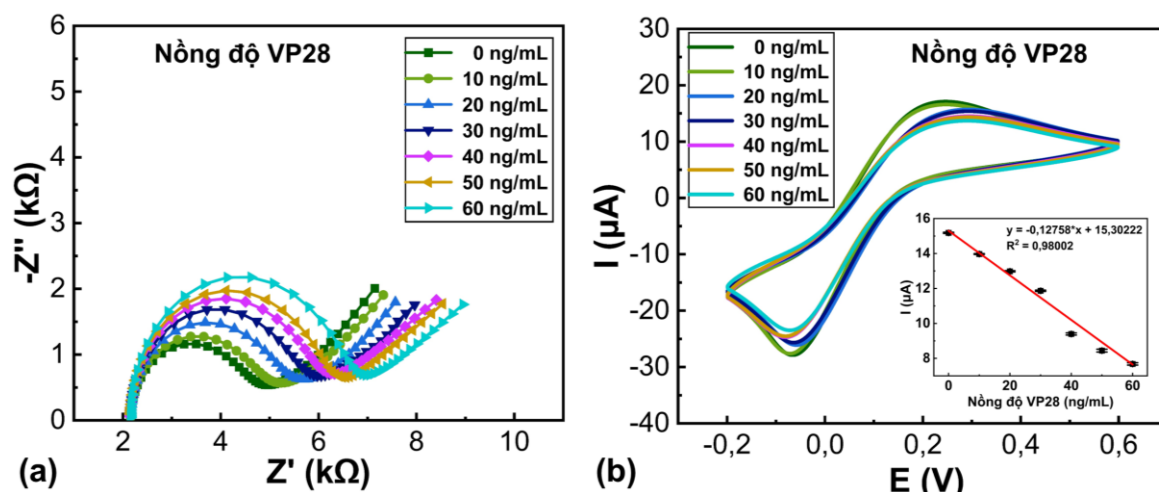


Hình 4.29. (a) Đồ thị Nyquist và (b) Đồ thị CV thay đổi trong quá trình biến tính từng bước để cố định đầu thu sinh học ở nồng độ 150 $\mu\text{g/mL}$: Kích hoạt SAM (activeMUA), cố định kháng thể (anti-VP28), chặn liên kết không đặc hiệu (BSA).

4.2.2.2. Phát hiện kháng nguyên VP28

Hình 4.30 minh họa kết quả đo phổ tổng trở EIS và CV của quá trình phát hiện kháng nguyên VP28 ở các nồng độ khác nhau. Đường kính của hình bán

nguyệt trên đồ thị Nyquist trong Hình 4.30a tăng phù hợp với sự giảm dần của các đỉnh dòng điện trong Hình 4.30b tương ứng với sự gia tăng nồng độ protein VP28.



Hình 4.30. (a) Đồ thị Nyquist đáp ứng EIS và (b) Đồ thị CV của quá trình phát hiện protein VP28 ở các nồng độ khác nhau.

Bảng 4.2. Khảo sát độ lặp lại của tín hiệu CV.

C_M (ng/mL)	Trung bình $I_{\max1}$ (μA)	Trung bình $I_{\max2}$ (μA)	Trung bình $I_{\max3}$ (μA)	Trung bình $I_{\max}$ (μA)	SD (μA)
0	15,150	15,215	15,178	15,181	0,033
10	13,965	13,950	13,997	13,971	0,024
20	12,983	12,945	13,015	12,981	0,035
30	11,850	11,844	11,908	11,867	0,035
40	9,330	9,448	9,405	9,394	0,060
50	8,537	8,397	8,395	8,443	0,081
60	7,725	7,716	7,604	7,682	0,067

Hình 4.30b cho thấy giá trị dòng điện cực đại anốt 15,150 μA , giảm dần xuống còn 13,965 μA , 12,986 μA , 11,850 μA , 9,330 μA , 8,537 μA và 7,725 μA tương ứng nồng độ protein VP28 tăng lên 10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL và 60 ng/mL. Để nghiên cứu độ ổn định của bề mặt điện cực, tín hiệu CV được đo ba lần cho mỗi lần phát hiện nồng độ. Dòng điện cực đại anốt trung bình và độ lệch chuẩn của các phép đo này được thể hiện trong Bảng 4.2 và biểu đồ chèn ở Hình 4.30b.

Kết quả khảo sát cho thấy giá trị dòng điện cực đại anôt (I_{max}) giảm dần khi nồng độ kháng nguyên VP28 tăng từ 10 đến 60 ng/mL. Dòng đỉnh anôt giảm khi nồng độ VP28 tăng do hiệu ứng phủ kín bề mặt của các phức hợp kháng thể–kháng nguyên hình thành nhiều hơn làm giảm diện tích bề mặt điện hoá hữu hiệu, tăng điện trở truyền điện tích làm cản trở quá trình trao đổi điện tích giữa dung dịch điện ly và bề mặt điện cực.

Đường hồi quy tuyến tính thu được có phương trình:

$$I_{max} = -0,12758 \times C_M + 15,30222 \quad (R^2 = 0,98002) \quad (4.2)$$

cho thấy mối tương quan tuyến tính giữa tín hiệu dòng điện và nồng độ VP28, chứng minh độ nhạy và tính ổn định cao của cảm biến.

Giá trị độ lệch chuẩn (SD) trong Bảng 4.2 nằm trong khoảng 0,024–0,081 μA , tương ứng hệ số biến thiên nhỏ ($<1\%$), khẳng định độ lặp lại tốt của các phép đo. Những kết quả này cho thấy hệ thống đo điện hoá và bề mặt điện cực hoạt động ổn định, có khả năng tái tạo tín hiệu tin cậy trong quá trình phát hiện kháng nguyên VP28.

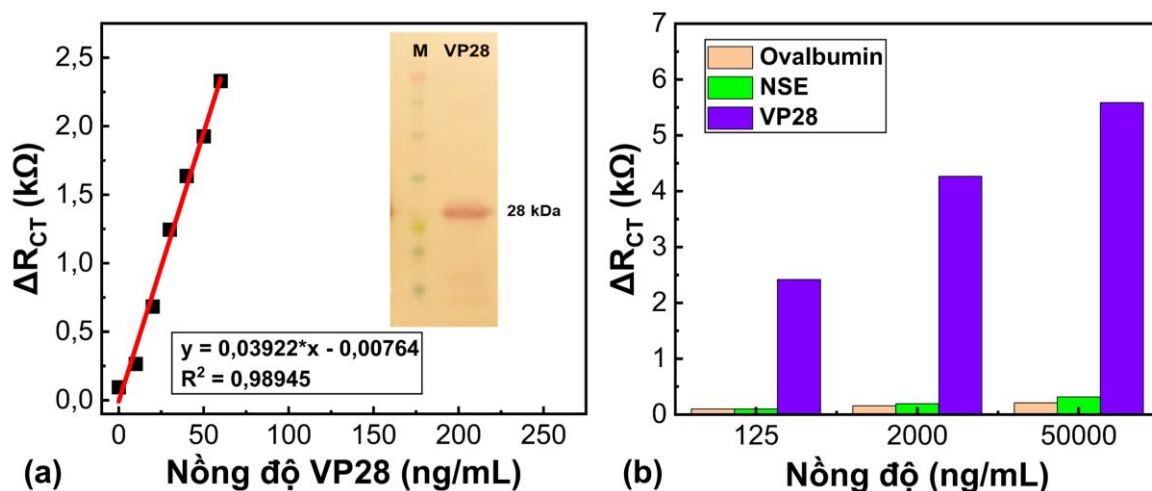
Phương pháp Western Blot được sử dụng để khảo sát sự bắt cặp đặc hiệu của cặp hoá chất chính anti-VP28 và VP28. Kết quả phương pháp Western Blot trên hình chèn Hình 4.31a đã chứng minh sự gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể anti-VP28 và kháng nguyên VP28. Sự xuất hiện của dải protein đặc trưng tại vị trí 28 kDa xác nhận rằng kháng thể anti-VP28 nhận biết chính xác protein VP28 của vi-rút WSSV. Điều này khẳng định tính đặc hiệu của cặp kháng nguyên–kháng thể được sử dụng trong hệ cảm biến điện hoá, đảm bảo độ tin cậy và độ chọn lọc cao trong quá trình phát hiện sinh học.

Hình 4.31a thể hiện đường hiệu chuẩn tuyến tính giữa độ thay đổi điện trở truyền điện tích ΔR_{CT} và nồng độ protein VP28 trong khoảng từ 10 ng/mL đến 60 ng/mL, với hệ số $R^2=0,98945$, được xác định theo phương trình:

$$\Delta R_{CT}(k\Omega) = 0,03922 \times C_M(\text{ng/mL}) - 0,00764 \quad (4.3)$$

Trong đó C_M là nồng độ của protein VP28.

Giới hạn phát hiện của điện cực cảm biến là 2,38 ng/mL, được tính theo công thức (3.2) với độ dốc của đường đặc tính từ công thức (4.3) bằng 0,03922 k Ω mL/ng, độ lệch chuẩn được tính toán dựa trên 3 giá trị mẫu trắng thu được từ điện cực CE/AuNPs/activeMUA/BSA/anti-VP28 bằng 0,03115 k Ω .



Hình 4.31. (a) Đường đặc tính sử dụng ΔR_{CT} làm hàm của nồng độ protein VP28 (Hình chèn: Phương pháp Western Blot phát hiện VP28. M: Thang Protein); (b) Độ chọn lọc của điện cực CE/AuNPS/activeMUA/BSA/anti-VP28 đối với protein Ovalbumin và NSE.

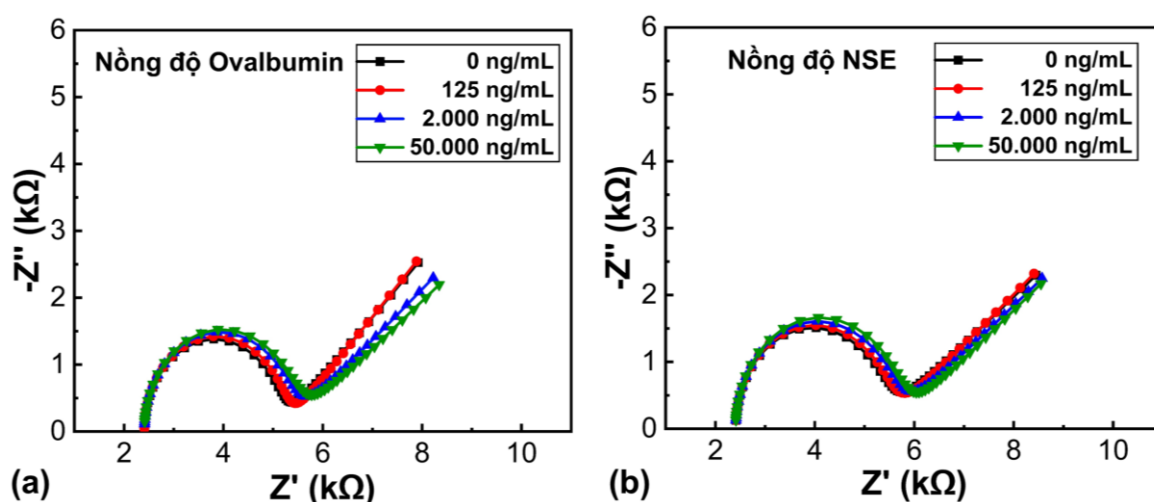
Khả năng tái tạo của điện cực cảm biến được kiểm tra bằng cách thí nghiệm thêm trên hai cảm biến khác theo cùng một quy trình. Kết quả cho thấy ΔR_{CT} thay đổi tuyến tính theo nồng độ kháng nguyên VP28 trong phạm vi từ 10 ng/mL đến 60 ng/mL đối với hai cảm biến này, với hệ số xác định (R^2) và độ dốc lần lượt là (0,99004 và 0,03948) và (0,98486 và 0,03860), được biểu diễn bằng các phương trình sau:

$$\Delta R_{CT}(\text{k}\Omega) = 0,03948 \times C_M(\text{ng/mL}) - 0,00924 \quad (4.4)$$

$$\Delta R_{CT}(\text{k}\Omega) = 0,03860 \times C_M(\text{ng/mL}) - 0,00119 \quad (4.5)$$

Để đánh giá tính đặc hiệu phát hiện VP28 của cảm biến CE/AuNPS/activeMUA/BSA/anti-VP28, luận án đã đánh giá khả năng phản ứng của cảm biến đối với các protein khác, cụ thể là NSE và Ovalbumin (Hình 4.31b).

Phổ trở kháng được trình bày trong Hình 4.32 minh họa phản ứng của điện cực cảm biến với các chất phân tích có chứa protein NSE và Ovalbumin. Mặc dù biến thiên dải nồng độ của NSE và Ovalbumin rất rộng, từ 125 ng/mL đến 50.000 ng/mL, đường kính của hình bán nguyệt trong tín hiệu EIS vẫn tương đối ổn định. Kết quả này nhấn mạnh tính đặc hiệu của điện cực cố định kháng thể anti-VP28 đối với protein VP28.



Hình 4.32. Đồ thị Nyquist đáp ứng EIS ở các nồng độ khác nhau của protein (a) Ovalbumin; (b) NSE.

Bảng 4.3 trình bày phân tích so sánh hiệu suất của cảm biến được chức năng hoá trong nghiên cứu này với các phương pháp phát hiện WSSV khác nhau. Các phương pháp được so sánh đều dựa trên cơ chế nhận biết miễn dịch kháng thể – kháng nguyên VP28, cho phép đánh giá trực tiếp sự thay đổi tín hiệu điện hoá tại bề mặt điện cực. Cơ chế phát hiện được áp dụng trong nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với các phương pháp so sánh, đặc biệt là các kỹ thuật CV và EIS, qua đó đảm bảo tính nhất quán và độ tin cậy của kết quả so sánh. Đặc biệt, cảm biến miễn dịch điện hoá được phát triển trong nghiên cứu này thể hiện ưu điểm nổi bật về độ nhạy cao, cấu trúc đơn giản và yêu cầu thể tích mẫu nhỏ, giúp hệ thống dễ dàng thích ứng cho các ứng dụng phát hiện tại chỗ và theo thời gian thực, đặc biệt phù hợp với các trang trại nuôi tôm còn hạn chế về trang thiết bị hiện đại và nhân lực kỹ thuật.

Bảng 4.3. Phân tích so sánh hiệu suất cảm biến với các công trình nghiên cứu khác.

Phương pháp phát hiện	Cơ chế	Thể tích mẫu	Dải phát hiện	LOD	Tài liệu tham khảo
CV	Kháng thể - kháng nguyên VP28	1 μ L	$1,37 \times 10^{-3}$ – $1,37 \times 10^7$ bản sao/ μ L	$1,37 \times 10^{-3}$ bản sao/ μ L	[20]
Trờ kháng	Kháng thể - kháng nguyên VP26	400 μ L	160 – 160000 bản sao	RSD 2,6%.	[29]
Điện dung	GST-WBP-WSSV	300 μ L	1 – 1×10^5 bản sao/ μ L	1 bản sao/ μ L	[54]
Áp điện trở	Kháng thể-VP28/kháng thể VP664 - WSSV	60 μ L	50 – 10^5 virions/mL	100 virions/mL	[36]
Trờ kháng điện hoá	Kháng thể - kháng nguyên VP28	10 μ L	10^2 – 10^9 DNA copies/mL	48,4 DNA bản sao/mL	[37]
Cộng hưởng plasmon bề mặt	Kháng thể - kháng nguyên A1 scFv	100 μ L	5 – 50 ng/mL	2,5 ng/mL	[143]
Phổ tổng trở điện hoá	Kháng thể - kháng nguyên VP28	2,7 μ L	10 – 60 ng/mL	2,38 ng/mL	Nghiên cứu này

4.2.2.3. Kết luận

Như vậy, trong phần này, luận án đã phát triển cảm biến miễn dịch đơn giản, ổn định, đặc hiệu và có độ nhạy và giới hạn phát hiện tốt để phát hiện protein vỏ VP28 của WSSV. Sự phủ thành công của AuNPs trên bề mặt điện cực cacbon là nền tảng cho sự thành công của quy trình chức năng hóa điện cực tiếp theo, cho phép phát hiện protein VP28 ở khoảng nồng độ từ 10-60 ng/mL. Quy trình đề xuất đã tạo ra sự thay đổi đáng kể về tín hiệu ΔR_{CT} ở các nồng độ khác nhau với hệ số đường cong đặc tính R^2 xấp xỉ 0,99, độ nhạy khoảng 0,04 k Ω /ng.mL⁻¹ trên cả 3 điện cực được triển khai. Do đó, cảm biến đề xuất là nền tảng, tạo điều kiện thuận lợi cho việc triển khai tích hợp cảm biến chức năng hoá điện cực và hệ thống đo lường, theo dõi theo thời gian thực nhằm ngăn ngừa và giảm thiểu thiệt hại do bệnh đốm trắng gây ra ở các trang trại nuôi tôm.

4.2.3. Kết quả phát hiện protein VP28 với hệ đo đề xuất

Tiếp nối kết quả đạt được ở phần trước với cảm biến miễn dịch đã được phát triển và hiệu chuẩn thành công, phần này trình bày hiệu năng phát hiện protein VP28 khi tích hợp cảm biến vào hệ đo điện hoá đề xuất. Thí nghiệm được thiết kế nhằm đánh giá khả năng thu nhận, xử lý và truyền tín hiệu điện hoá theo thời gian thực, đồng thời kiểm chứng tính ổn định, độ chính xác và độ lặp lại của phép đo trong điều kiện vận hành thực nghiệm. Các kết quả thu được cho phép xác nhận tính khả thi của việc kết hợp giữa phần cứng đo điện hoá và cảm biến chức năng hoá bề mặt trong phát hiện nhanh protein VP28 của WSSV.

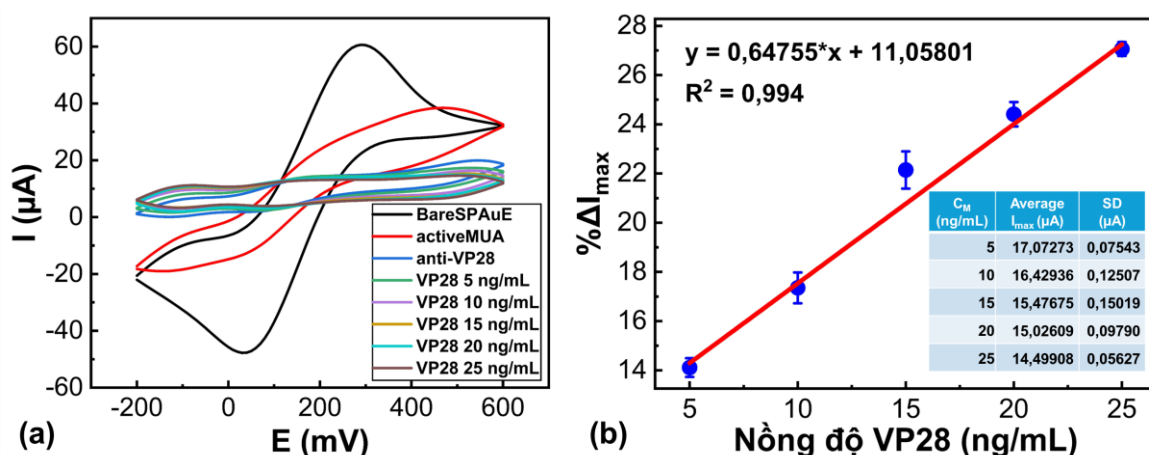
4.2.3.1. Khảo sát quy trình biến tính và phát hiện protein VP28 với hệ đo WPEMS

Hình 4.33a mô tả sự biến đổi của các đỉnh dòng trong các đồ thị CV, bao gồm sự thay đổi về hình dạng, vị trí và cường độ sau mỗi bước của quá trình sửa đổi bề mặt điện cực: hình thành và hoạt hoá SAM MUA (activeMUA), cố định kháng thể (anti-VP28) và bắt giữ protein mục tiêu (VP28) với các nồng độ khác nhau. Điều này cho thấy sự hình thành các lớp vật liệu mới trên bề mặt điện cực. Đỉnh dòng điện giảm dần và trở nên rộng hơn tương quan với sự tăng của nồng độ VP28 từ 5 đến 25 ng/mL. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố [54] và nhất quán với kết quả ở mục 4.2.2. của luận án [144], khi sử dụng các hệ thống đo thương mại.

Hình 4.33b thể hiện đường đặc trưng sử dụng phần trăm biến đổi trong dòng đỉnh $\% \Delta I_{\max}$ làm hàm số của nồng độ kháng nguyên VP28, được biểu diễn bởi phương trình sau:

$$\% \Delta I_{\max} = 0,64755 \times C_M(\text{ng/mL}) + 11,05801 \quad (4.6)$$

với hệ số R^2 là 0,994 và giới hạn phát hiện (LOD) là 2,38 ng/mL.



Hình 4.33. (a) Tín hiệu đo CV của quy trình chức năng hóa và phát hiện protein VP28 ở các nồng độ khác nhau; (b) Đường đặc tính sử dụng $\% \Delta I_{\max}$ làm hàm của nồng độ protein VP28. Mỗi thí nghiệm phát hiện VP28 được thực hiện bốn lần và lặp lại trên ba cảm biến khác nhau.

Bảng 4.4. Giá trị dòng điện cực đại trung bình của ba cảm biến khác nhau tại các nồng độ VP28 (được đo lặp lại 4 lần cho mỗi cảm biến).

C_M (ng/mL)	Au1 Trung bình $I_{\max}$ (μA)	Au2 Trung bình $I_{\max}$ (μA)	Au3 Trung bình $I_{\max}$ (μA)	Trung bình $I_{\max}$ (μA)	SD (μA)
5	16,99013	17,13794	17,09013	17,07273	0,07543
10	16,31723	16,56424	16,40661	16,42936	0,12507
15	15,51205	15,60614	15,31205	15,47675	0,15019
20	14,91904	15,11107	15,04817	15,02609	0,09790
25	14,43954	14,55139	14,50631	14,49908	0,05627

Mỗi thí nghiệm phát hiện VP28 được thực hiện bốn lần và lặp lại trên ba cảm biến khác nhau. Bảng chèn trên Hình 4.33b trình bày dữ liệu dưới dạng giá trị dòng điện cực đại trung bình $\pm$ SD cho ba cảm biến này. Chi tiết của bảng chèn trên Hình 4.33b được cung cấp ở Bảng 4.4. Kết quả cho thấy giá trị dòng điện cực đại trung bình ($I_{\max}$) giảm dần khi nồng độ kháng nguyên VP28 tăng từ 5 đến 25 ng/mL, thể hiện xu hướng đặc trưng của cơ chế cảm biến miễn dịch dựa trên cản trở truyền điện tích. Khi lượng kháng nguyên VP28 tăng, các phức hợp kháng thể–kháng nguyên hình thành nhiều hơn, che phủ bề mặt điện cực, làm giảm diện tích hoạt động điện hoá và do đó dòng đỉnh giảm. Độ lệch chuẩn (SD) của các phép đo trong khoảng

0,056–0,150 μA , tương ứng hệ số biến thiên nhỏ ($<1\%$), chứng tỏ độ lặp lại và độ tin cậy cao của cảm biến.

Xu hướng suy giảm dòng đỉnh quan sát được trên hệ đo đề xuất hoàn toàn phù hợp với cơ chế đã được phân tích trên hệ đo thương mại với cùng quy trình chức năng hóa. Quá trình hình thành lớp SAM, cố định kháng thể anti-VP28, chặn liên kết không đặc hiệu và bắt giữ protein VP28 làm cản trở quá trình truyền điện tích, dẫn đến sự suy giảm dòng đỉnh. Do hệ đo đề xuất sử dụng cùng quy trình chức năng hóa và điều kiện đo như hệ đo thương mại, sự thay đổi tín hiệu CV thu được phản ánh cùng bản chất điện hóa, qua đó khẳng định hệ đo đề xuất có khả năng tái hiện cơ chế phát hiện của cảm biến.

Bảng 4.5. So sánh kết quả nghiên cứu đề xuất với các công trình khác.

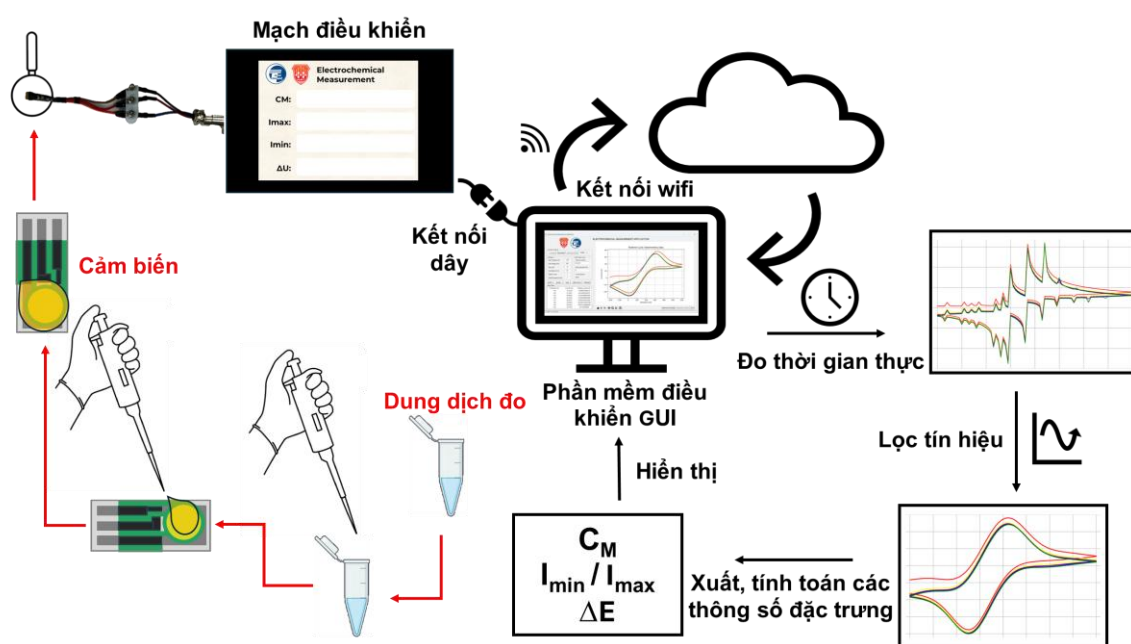
Phương pháp	Điện cực	Mục tiêu	Thể tích mẫu	Dải phát hiện	Giới hạn phát hiện	Dải quét	Đỉnh/ Điện áp đỉnh	Hệ đo	TLTK
CV	Glassy Cacbon	VP28, WSSV trong các mẫu tôm, cua	1 μL	$1,37 \times 10^{-3}$ copies/ μL đến $1,37 \times 10^7$ copies/ μL	$1,37 \times 10^{-3}$ copies/ μL	-0,8 V đến 0,4 V	Equilibrium potential $((E_{pa}+E_{pc})/2)/-0,4\text{ V}$	CHI440B CH Instrument, US	[20]
Kiểu tụ, CV để kiểm tra các bước biến tính	Vàng	WSSV trong mẫu nước hồ tôm	300 μL	1 đến 10^5 copies/ μL	20 copies/ μL	-0,3 V đến 0,7 V	Đỉnh oxi hoá/ $\sim 0,5\text{ V}$	Eco Chemie μ -Autolab B.V., Utrecht, Nederland	[54]
CV	Vàng	VP28	3 μL	5 đến 25 ng/mL	2,38 ng/mL	-0,2 V đến 0,6 V	Đỉnh oxi hoá/ 0,51 V đến 0,53 V	Thiết bị cầm tay tự phát triển WPEMS	Nghiên cứu này

Bảng 4.5 so sánh các kết quả nghiên cứu này với các công trình nghiên cứu khác đã công bố về phát hiện WSSV, sử dụng cơ chế liên kết kháng nguyên-kháng thể VP28 để phát hiện WSSV trong các mẫu tôm và cua penaeid [20], và cơ chế liên kết GST-WBP (glutathione-S-transferase tag for white spot binding protein) - protein đốm trắng để phát hiện WSSV trong nước ao nuôi tôm [54], với thể tích mẫu tương đối lớn (300 μL) và sử dụng hệ thống đo điện hóa thương mại để bàn. So với các công trình này, thiết bị và quy trình được đề xuất trong luận án cho thấy nhiều ưu điểm nổi bật, bao gồm thể tích mẫu đo rất nhỏ (3 μL), giới hạn phát hiện

thấp (2,38 ng/mL), dải đo và cơ chế phát hiện phù hợp cho ứng dụng chẩn đoán thực tế, đồng thời tích hợp thành công trên thiết bị cảm tay WPEMS. Những kết quả này không chỉ khẳng định hiệu suất và độ tin cậy của phương pháp đề xuất, mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong giám sát và chẩn đoán nhanh WSSV ngoài phòng thí nghiệm, đáp ứng yêu cầu thực tiễn trong nuôi trồng thủy sản.

Để kiểm tra độ đặc hiệu, điện cực anti-VP28 được ủ trong dung dịch VP28 15 ng/mL có bổ sung protein NSE thu được tín hiệu $\% \Delta I_{\max}$ với sai số 1,92% so với dung dịch VP28 tinh khiết ở nồng độ 15 ng/mL. Kết quả cho thấy khả năng của thiết bị WPEMS trong việc phát hiện WSSV nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả. Điều này đáp ứng nhu cầu cấp thiết trong việc phát triển các thiết bị điện tử nhỏ gọn, thân thiện với người dùng cho kiểm tra tại chỗ, giảm thiểu các rủi ro liên quan đến thiệt hại do dịch bệnh [20].

4.2.3.2. Kết luận



Hình 4.34. Phương thức vận hành thiết bị.

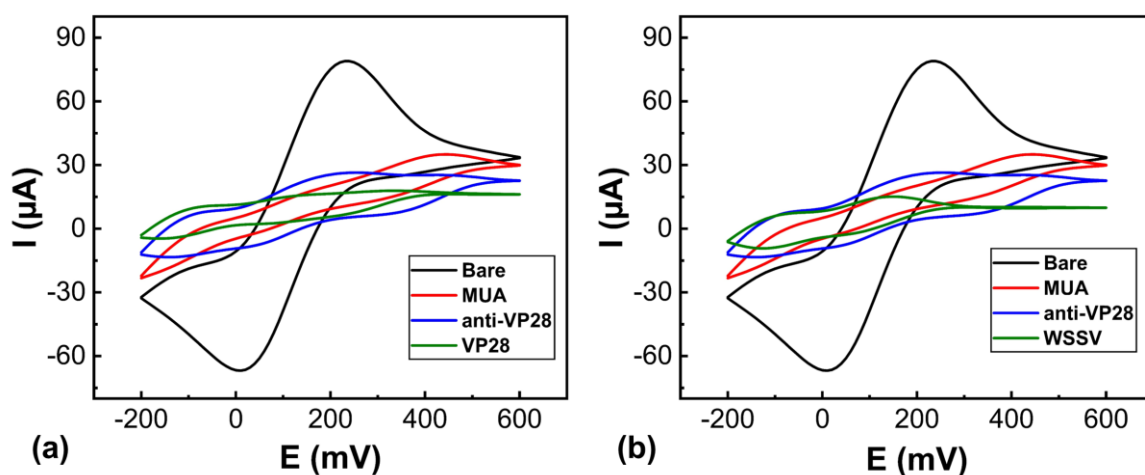
Như đã đề cập ở trên, VP28, protein chỉ dấu sinh học, được sử dụng rộng rãi để phát hiện vi-rút gây hội chứng đốm trắng WSSV do nó có nhiều trong vỏ vi-rút [33], [34]. Mức độ biểu hiện cao của nó cho phép các phương pháp phát hiện nhạy,

tạo điều kiện thuận lợi cho việc chẩn đoán và kiểm soát sớm WSSV trong môi trường nuôi trồng thủy sản [37]. Với hiện trạng cơ sở xét nghiệm, chẩn đoán thường thiếu ở các trang trại, các phương pháp phát hiện VP28 tại chỗ là rất cần thiết. Do đó, trong phần này, luận án phát triển thành công hệ thống đo điện hóa không dây WPEMS phát hiện VP28, bao gồm cảm biến miễn dịch, mạch đo điện hóa tích hợp và giao diện đồ họa thân thiện với người dùng (Hình 4.34). Kết hợp nền tảng kiến trúc tổng thể đã được trình bày ở Hình 3.6, Hình 4.34 mô tả chi tiết quy trình vận hành và luồng dữ liệu của hệ thống, từ protein VP28 tương tác với lớp kháng thể cố định trên bề mặt điện cực, tạo ra tín hiệu điện hóa được thu nhận và xử lý bởi mạch đo, đến quá trình truyền dữ liệu qua nền tảng Cloud bằng giao thức MQTT và hiển thị kết quả trên máy tính, ứng dụng di động. Thông qua phân tích phép đo CV trên cảm biến vàng được chức năng hóa, kháng thể anti-VP28 được cố định thông qua lớp SAM MUA, hệ thống thể hiện mối tương quan tuyến tính mạnh mẽ giữa mức độ biến thiên quan sát được ở dòng điện cực đại và nồng độ VP28 từ 5 đến 25 ng/mL với hệ số R^2 là 0,994.

4.2.4. Kết quả bước đầu phát hiện WSSV trên mẫu thực với hệ đo WPEMS đề xuất

Sau khi xác nhận được độ nhạy và tính tuyến tính cao của hệ đo WPEMS trong việc phát hiện protein VP28 tinh khiết, bước tiếp theo của nghiên cứu là đánh giá khả năng ứng dụng thực tế của hệ thống trong phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên mẫu thực sinh học. Phần này trình bày các kết quả thử nghiệm sử dụng mẫu tôm dương tính với WSSV nhằm kiểm chứng hiệu quả phát hiện của hệ đo WPEMS trong điều kiện mẫu thực tế.

Các điện cực SPAuE chức năng hóa kháng thể anti-VP28, sau khi ủ trong dung dịch protein VP28 tinh khiết và dung dịch mẫu tôm WSSV, được quét CV trong dung dịch điện ly. Kết quả cho thấy mức suy giảm dòng đỉnh anốt tương đối $\% \Delta I_{\max}$ đạt 32,25% đối với mẫu VP28 tinh khiết (đối chứng dương) và 42,75% đối với mẫu tôm dương tính với WSSV (Hình 4.35).



Hình 4.35. Tín hiệu đo CV của quy trình chức năng hóa và phát hiện (a) protein VP28; (b) WSSV.

Kết hợp với Hình 4.35, Bảng 4.6 trình bày chi tiết các giá trị dòng đỉnh anốt thu được từ phép đo quét thế tuần hoàn CV tương ứng với từng trạng thái bề mặt điện cực SPAAuE, bao gồm điện cực trần, điện cực phủ MUA, điện cực đã chức năng hóa kháng thể anti-VP28, và điện cực sau khi tương tác với protein VP28 tinh khiết (đối chứng dương) cũng như mẫu tôm dương tính với WSSV.

Bảng 4.6. Giá trị dòng đỉnh anốt của điện cực SPAAuE trong các bước chức năng hóa và phát hiện WSSV bằng phép đo CV và mức suy giảm tín hiệu $\% \Delta I_{\max}$ phát hiện WSSV.

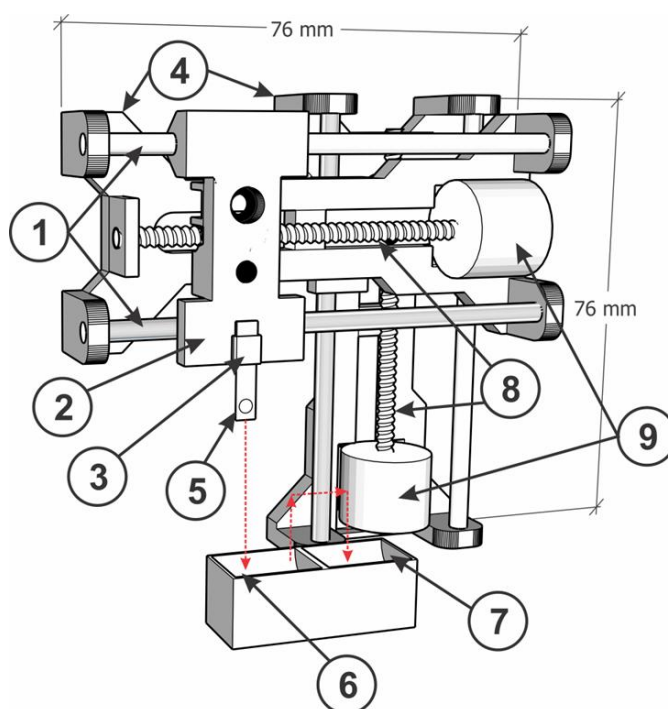
Mẫu	$I_{\max} (\mu A)$	$\Delta I_{\max} (\mu A)$	$\% \Delta I_{\max}$
Điện cực trần	78,97158		
Điện cực phủ MUA	35,03239		
Điện cực đã chức năng hoá anti-VP28	26,43859		
Điện cực phát hiện VP28 (đối chứng dương)	17,91336	8,52523	32,25%
Điện cực phát hiện WSSV (n_1)	15,13690	11,30169	42,75%
Điện cực phát hiện WSSV (n_2)	15,21704	11,22155	42,44%
Điện cực phát hiện WSSV (n_3)	15,20856	11,23003	42,48%

Kết quả cho thấy $I_{\max}$ giảm tuần tự qua các bước chức năng hóa và quá trình nhận biết sinh học, phản ánh sự hình thành lớp sinh học cách điện trên bề mặt điện cực, làm cản trở quá trình truyền điện tích. Mức suy giảm dòng đỉnh tương đối

$\% \Delta I_{\max}$ đạt 32,25% đối với mẫu VP28 tinh khiết (đối chứng dương) và đạt 42,75% đối với mẫu tôm nhiễm WSSV, cho thấy tín hiệu điện hóa thu được từ mẫu sinh học thực tế rõ rệt và có độ nhạy cao. Các phép đo lặp lại trên mẫu tôm nhiễm WSSV (n_1-n_3) cho giá trị dòng đỉnh trung bình đạt $15,19 \pm 0,04 \mu A$, độ lệch chuẩn tương đối 0,29%, cho thấy độ lặp lại và độ ổn định cao của hệ đo. Những kết quả này khẳng định khả năng ứng dụng của hệ đo WPEMS trong phát hiện WSSV trên mẫu thực, không chỉ giới hạn ở phát hiện protein tinh khiết trong điều kiện phòng thí nghiệm.

4.3. Một số đề xuất

4.3.1. Đề xuất hệ thống tự động điều khiển chu trình cảm biến



Hình 4.36. Hệ thống đề xuất điều khiển tự động chuyển động cảm biến. Hành trình cảm biến: mũi tên màu đỏ.

Để theo dõi bệnh đốm trắng tại chỗ và thời gian thực ở trang trại nuôi tôm trong điều kiện nguồn lực hạn chế, hệ thống điều khiển tự động chuyển động của cảm biến được đề xuất trên Hình 4.36 bao gồm 9 thành phần chính: (1) Trục tròn, (2) con trượt, (3) đế cảm biến, (4) giá đỡ, (5) cảm biến, (6) hộp chứa dung dịch mẫu, (7) hộp chứa dung dịch đo, (8) trục vítme, (9) động cơ bước. Động cơ bước

nối với trục truyền động vitme, chuyển động theo 2 phương (ngang và dọc). Con trượt được thiết kế để chuyển chuyển động xoắn của trục vitme thành chuyển động dài và chuyển động trên thanh tròn. Ngoài ra nó còn là khung lắp đặt cho đế cảm biến. Hành trình của cảm biến được thể hiện bằng mũi tên màu đỏ, bắt đầu từ dung dịch mẫu và kết thúc ở dung dịch đo.

4.3.2. Đề xuất ứng dụng học máy trong dự đoán nhiễm WSSV

Việc lựa chọn thuật toán học máy (Machine Learning – ML) phù hợp để dự đoán nhiễm WSSV dựa trên dữ liệu điện hóa phụ thuộc vào đặc trưng của bộ dữ liệu, kích thước mẫu và độ phức tạp của bài toán dự đoán. Đối với các mẫu thực được thu thập trong các điều kiện môi trường khác nhau, việc ứng dụng ML giúp tăng cường khả năng phân loại, phát hiện bất thường và dự đoán sớm tín hiệu nhiễm bệnh từ dữ liệu cảm biến.

Liên quan đến nghiên cứu này, hai thuật toán học máy được đề xuất triển khai là Support Vector Machines (SVM) và Naive Bayes (NB), vốn đã chứng minh hiệu quả trong nhiều ứng dụng sinh học và dự đoán protein.

- (1) Support Vector Machines (SVM):

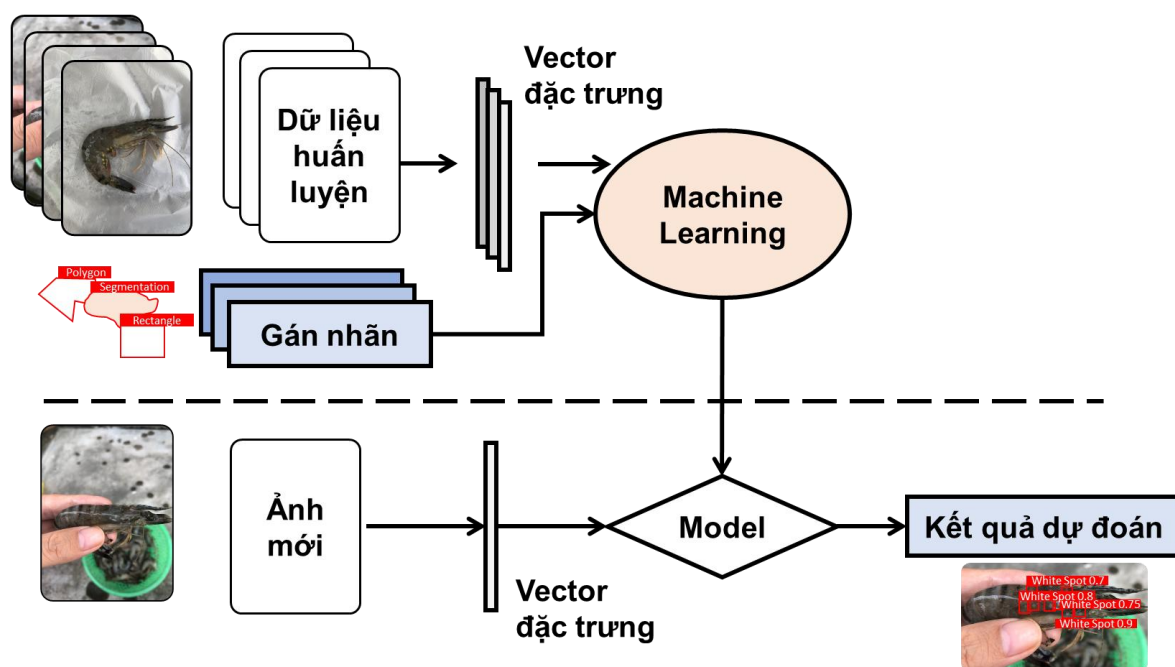
SVM là một thuật toán phân loại mạnh mẽ có khả năng xử lý dữ liệu nhiều chiều và tìm kiếm ranh giới tối ưu giữa các nhóm dữ liệu. Nhờ vào các hàm nhân (kernel), SVM có thể nhận diện các mẫu phi tuyến tính trong dữ liệu phức tạp, do đó rất phù hợp để phân tích tín hiệu điện hóa vốn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố môi trường. SVM đã được ứng dụng thành công trong các bài toán tin sinh học như phân loại trình tự gen, dự đoán cấu trúc và chức năng protein.

- (2) Naive Bayes (NB):

Naive Bayes là một thuật toán phân loại xác suất đơn giản nhưng hiệu quả, dựa trên định lý Bayes và giả định độc lập có điều kiện giữa các đặc trưng. Thuật toán này đặc biệt hữu ích với dữ liệu đa chiều, có tốc độ huấn luyện nhanh và khả năng tổng quát tốt, phù hợp cho các ứng dụng phân tích dữ liệu điện hóa trong phát

hiện protein. Naive Bayes đã được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu tin sinh học để phân loại mẫu gen, dự đoán chức năng protein và nhận dạng mẫu dữ liệu.

Hai mô hình SVM và NB được đề xuất triển khai và so sánh để xác định mô hình phù hợp nhất cho nhiệm vụ dự đoán nhiễm WSSV dựa trên dữ liệu điện hóa phát hiện protein VP28. Hiệu năng của các mô hình sẽ được đánh giá thông qua các chỉ số như độ chính xác (accuracy), độ nhạy (sensitivity), độ đặc hiệu (specificity) và giá trị F1, kết hợp với phương pháp xác thực chéo (cross-validation) để đảm bảo tính tin cậy của kết quả.



Hình 4.37. Minh họa quy trình ứng dụng học máy trong phát hiện tôm nhiễm WSSV sử dụng YOLO Object Detection.

Hình 4.37 minh họa quy trình xây dựng mô hình học máy ban đầu cho phát hiện tôm nhiễm đốm trắng, bao gồm: (i) gán nhãn dữ liệu hình ảnh bằng khung chữ nhật, (ii) huấn luyện mô hình phát hiện đối tượng (Object Detection) sử dụng YOLO, và (iii) phát hiện, định vị các đối tượng đã được huấn luyện trên các ảnh mới.

Kết luận chương

Trong chương này, các kết quả nghiên cứu đã chứng minh sự thành công quy trình chức năng hóa điện cực và hệ thống đo điện hóa di động không dây WPEMS trong việc phát hiện protein VP28 - chỉ dấu sinh học đặc trưng của vi-rút WSSV.

Về cấu phần cảm biến, các thí nghiệm đối chứng với protein BSA-FITC đã làm rõ vai trò quan trọng của lớp SAM (MUA và L-Cysteine) trong việc cố định kháng thể và nâng cao độ ổn định của bề mặt điện cực. Trong đó, lớp MUA tạo nên cách điện ổn định, L-Cysteine hỗ trợ truyền điện tích nhanh hơn, qua đó định hướng lựa chọn vật liệu SAM phù hợp cho phát triển cảm biến điện hoá. Bên cạnh đó, quá trình phủ AuNPs trên điện cực cacbon (CE) đã cải thiện đáng kể độ dẫn và diện tích hoạt động, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình thành lớp SAM và gắn anti-VP28. Cảm biến CE/AuNPs/activeMUA/BSA/anti-VP28 cho thấy quan hệ tuyến tính tốt giữa ΔR_{CT} và nồng độ VP28 ($R^2 = 0,989$), với giới hạn phát hiện 2,38 ng/mL, đồng thời thể hiện tính lặp lại và chọn lọc cao trước các protein không đặc hiệu.

Các kết quả thu được không chỉ khẳng định hiệu quả của quy trình chức năng hóa bề mặt điện cực trong phát hiện protein VP28 mà còn cho thấy tiềm năng mở rộng của công nghệ lõi. Quy trình tương tự đã được áp dụng thành công cho phát hiện protein NSE – chỉ dấu sinh học đặc trưng của ung thư phổi, qua đó chứng minh khả năng phát triển cảm biến điện hóa đa mục tiêu. Chi tiết về việc ứng dụng quy trình chức năng hoá điện cực trong phát hiện protein NSE được trình bày trong Phụ lục 2, làm rõ hơn tính khả thi và đa ứng dụng của công nghệ được đề xuất.

Về hệ thống đo điện hoá WPEMS, các phép thử cho thấy hệ thống hoạt động ổn định và chính xác trong cả hai chế độ đo có dây và không dây. Ứng dụng Android và phần mềm điều khiển được phát triển cho phép hiển thị, cập nhật và lưu trữ dữ liệu đo theo thời gian thực, đồng thời trích xuất tự động giá trị cực đại, cực tiểu và tính toán nồng độ. Khi tích hợp cảm biến vào hệ đo WPEMS, phép đo CV trên điện cực vàng cố định anti-VP28 cho thấy quan hệ tuyến tính mạnh giữa $\% \Delta I_{max}$ và nồng độ VP28 trong dải 5–25 ng/mL theo phương trình $\% \Delta I_{max} =$

$0,64755 \times C_M + 11,05801$ với $R^2 = 0,994$ và $LOD = 2,38$ ng/mL. Các thí nghiệm đo lặp lại 4 lần trên 3 cảm biến độc lập cho $SD = 0,056-0,150$ μA , tương ứng hệ số biến thiên (RSD) nhỏ hơn 1%, chứng tỏ độ ổn định và tái lập cao.

Đáng chú ý, trong khi nhiều nghiên cứu gần đây về phát hiện WSSV chủ yếu tập trung vào phát triển cấu trúc cảm biến và vẫn sử dụng các hệ thống đo điện hóa thương mại trong phòng thí nghiệm [145], nghiên cứu này đã xây dựng thành công hệ thống đo điện hóa di động không dây WPEMS có tiềm năng hoạt động độc lập trên thực địa. Thiết bị được phát triển từ các linh kiện điện tử phổ thông, tích hợp nguồn pin, màn hình hiển thị và kết nối IoT, cho phép thu nhận, xử lý và truyền dữ liệu theo thời gian thực. WPEMS không chỉ duy trì độ chính xác và độ ổn định mà còn có ưu thế rõ rệt về tính cơ động, chi phí.

Các kết quả thực nghiệm trên mẫu tôm dương tính WSSV đã xác nhận khả năng phát hiện tại chỗ VP28 nhanh chóng và chính xác, qua đó khẳng định tính khả thi và tiềm năng ứng dụng thực tế của hệ thống WPEMS trong giám sát và cảnh báo dịch bệnh tôm nuôi.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Qua quá trình thực hiện, luận án đã hoàn thành các mục tiêu đề ra, bao gồm nghiên cứu công nghệ cảm biến điện hóa, xác định đầu thu sinh học phù hợp, phát triển quy trình chức năng hóa điện cực, và đánh giá hiệu năng của hệ thống phát hiện vi-rút gây bệnh đốm trắng WSSV trên tôm nuôi. Trên cơ sở lý thuyết về điện hóa, cấu trúc vi-rút WSSV và cơ chế bắt cặp kháng thể–kháng nguyên, nghiên cứu đã xác định được kháng thể anti-VP28 là đầu thu sinh học đặc hiệu để cố định trên điện cực cảm biến. Kháng thể này cho phép nhận biết protein vỏ VP28, chỉ dấu sinh học đặc trưng của WSSV, tạo nền tảng cho quá trình phát hiện vi-rút bằng phương pháp điện hóa.

Quy trình chức năng hóa điện cực được xây dựng và kiểm chứng qua ba giai đoạn chính. Đầu tiên, các hạt nano vàng (AuNPs) được phủ lên bề mặt điện cực bằng kỹ thuật quét thế tuần hoàn (CV), giúp tăng cường khả năng dẫn điện và mở rộng diện tích bề mặt hoạt hóa đối với điện cực cacbon (các điện cực vàng được chức năng hoá bắt đầu từ bước tiếp theo). Tiếp theo, đơn lớp tự lắp ráp SAM được hình thành từ hợp chất MUA pha trong dung dịch ethanol, đóng vai trò là lớp trung gian ổn định cho việc gắn kết sinh học. Cuối cùng, kháng thể anti-VP28 được cố định lên bề mặt điện cực thông qua liên kết cộng hóa trị, tạo nên cảm biến điện hóa có tính đặc hiệu cao đối với vi-rút WSSV.

Trong quy trình chức năng hoá điện cực, các phép đo điện hóa EIS cho thấy sự thay đổi rõ rệt của điện trở truyền điện tích (ΔR_{CT}) theo nồng độ protein VP28, quan hệ tuyến tính được biểu diễn theo phương trình $\Delta R_{CT}(k\Omega) = 0,03922 \times C_M(ng/mL) - 0,00764$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,98945$, giới hạn phát hiện đạt mức 2,38 ng/mL, thể hiện độ nhạy cao của cảm biến. Các thí nghiệm đối chứng với protein Ovalbumin và NSE khẳng định cảm biến có độ chọn lọc tốt, chỉ phản ứng đặc hiệu với protein mục tiêu VP28.

Bên cạnh đó, tính mới của luận án được thể hiện qua việc phát triển thành công hệ thống đo điện hóa di động WPEMS với mạch điều khiển tích hợp và phần

mềm điều khiển thân thiện, cho phép thực hiện phép đo CV, xử lý và hiển thị dữ liệu theo thời gian thực. Sự thay đổi của đỉnh dòng điện trong phép đo CV thể hiện mối tương quan rõ ràng với nồng độ protein VP28, cung cấp tín hiệu định lượng phục vụ phát hiện nhanh vi-rút WSSV. Phép đo CV trên điện cực vàng cố định anti-VP28 cho thấy quan hệ tuyến tính mạnh giữa $\% \Delta I_{\max}$ và nồng độ VP28 trong dải 5–25 ng/mL theo phương trình $\% \Delta I_{\max} = 0,64755 \times C_M + 11,05801$ với $R^2 = 0,994$ và $\text{LOD} = 2,38 \text{ ng/mL}$. Kết quả này chứng minh tính khả thi của việc phát triển thiết bị cảm biến điện hóa di động phục vụ chẩn đoán sớm bệnh đốm trắng tại hiện trường, góp phần giảm thiểu thiệt hại và hỗ trợ kiểm soát dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

Để hoàn thiện và mở rộng kết quả nghiên cứu, cần tiếp tục đánh giá hệ thống trên số lượng mẫu lớn hơn trong điều kiện nuôi thực tế, bao gồm mẫu tôm khỏe (đối chứng âm), mẫu tôm nhiễm WSSV với các mức độ khác nhau và các mẫu tôm nhiễm các bệnh khác như EHP, AHPND. Kết quả sẽ giúp đánh giá toàn diện độ đặc hiệu, độ ổn định, độ tin cậy và khả năng ứng dụng của hệ thống trong điều kiện thực tế, đồng thời tạo cơ sở cho việc hoàn thiện và hướng tới thương mại hóa thiết bị.

Thiết bị đo điện hóa di động cần được tối ưu về kích thước, năng lượng tiêu thụ và khả năng kết nối không dây để phục vụ giám sát từ xa và cảnh báo dịch bệnh. Bên cạnh đó, hệ thống có thể được tích hợp khe cắm thẻ nhớ SD hoặc sử dụng bộ nhớ Flash nội bộ của ESP32 để lưu trữ tạm thời dữ liệu trong trường hợp mất kết nối mạng. Khi kết nối được khôi phục, dữ liệu đã lưu sẽ được tự động truyền lên máy chủ để cập nhật đầy đủ dữ liệu.

Hướng nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung mở rộng nền tảng công nghệ cảm biến điện hóa này cho việc phát hiện nhiều tác nhân gây bệnh khác trong thủy sản, hướng tới phát triển hệ thống cảm biến đa mục tiêu phục vụ giám sát sức khỏe vật nuôi một cách toàn diện. Hơn hết, cần có sự hợp tác giữa các cơ sở nghiên cứu, trung tâm kiểm nghiệm và doanh nghiệp trong lĩnh vực thủy sản nhằm phát triển

hoàn thiện thiết bị chẩn đoán tại chỗ, góp phần vào chiến lược phát triển nông nghiệp công nghệ cao và bền vững tại Việt Nam.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Nghiên cứu sinh là tác giả chính của các công trình khoa học sau:

A. Tạp chí

- [1] **Linh Huynh Thi Thuy**, Phu Nguyen Dang, Loc Do Quang, Tung Thanh Bui, Hanh Hong Mai, Chun-Ping Jen, Hung Cao, Trinh Chu Duc, “*Critical Role of 11-Mercaptoundecanoic Acid and L-Cysteine Self-Assembled Monolayers in Electrochemical Immunosensor Development*”, (2026), Journal of Applied Electrochemistry (Electronic ISSN: 1572-8838, Print ISSN: 0021-891X), Vol. 56, No. 115, <https://doi.org/10.1007/s10800-026-02496-1>, Impact Factor: 3.0, WoS Q2.
- [2] **Linh Huynh Thi Thuy**, Phu Nguyen Dang, Hung Cao, Anh H. Nguyen, Jung-Chih Chiao, Chun-Ping Jen, Loc Do Quang, Trinh Chu Duc, and Tung Thanh Bui, “*Electrodeposition of Gold Nanoparticles for a Highly Sensitive Immunosensor for White Spot Syndrome Virus (WSSV) Envelope Protein VP28 Detection Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy Technique*”, (2024), IEEE Sensors Journal (ISSN: 1530-437X/1558-1748), Vol. 24, No. 22, p36350-36357, <https://doi.org/10.1109/JSEN.2024.3468318>. Impact Factor: 4.32, WoS Q1.
- [3] **Linh Huynh Thi Thuy**, Minh Le Quang Nhat, Phu Nguyen Dang, Hung Cao, Hung Anh Nguyen, Jung-Chih Chiao, Chun-Ping Jen, Loc Do Quang, Trinh Chu Duc, and Tung Thanh Bui, “*Wireless and Portable Electrochemical Measurement System Integrated with Screen-Printed Immunosensor for VP28 Protein Detection*”, (2024), IEEE Sensors Letters (ISSN: 24751472), Vol. 8, No. 10, p4503204, <https://doi.org/10.1109/LSSENS.2024.3432588>. Impact Factor: 2.78, WoS Q2.
- [4] **Linh Huynh Thi Thuy**, Chun-Ping Jen, Guan-Da Syu, Nha Vo Quang, Cuong Ngo Xuan, Loc Do Quang, Phu Nguyen Dang, Tung Bui Thanh, Trinh Chu Duc, “*Enhancing the Self-Assembled Monolayer Formation for Protein Detection Platform through L-Cysteine Utilization*”, (2024), Hue University Journal of Science: Techniques and Technology (pISSN: 2588-1175, eISSN: 2615-9732), Vol. 133, No. 2B, p5-15, <https://doi.org/10.26459/hueunijtt.v133i2B.7366>.

B. Kỹ yếu Hội nghị

- [5] **Linh Huynh Thi Thuy**, Phu Nguyen Dang, Hung Cao, Hung Anh Nguyen, Jung-Chih Chiao, Chun-Ping Jen, Loc Do Quang, Trinh Chu Duc, Tung Thanh Bui, “*A Highly Sensitive Immunosensor for White Spot Syndrome Virus (WSSV) Envelope Protein VP28 Detection Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy Technique*”, (2023), IEEE SENSORS Conference, IEEE Xplore (ISBN:979-8-3503-0387-2, ISSN: 2168-9229), p1-4, <https://doi.org/10.1109/SENSORS56945.2023.10325273>.
- [6] **Linh Huynh Thi Thuy**, Phu Nguyen Dang, Chi Tran Nhu, Thuy Nguyen Tran, Trung Le Thanh, Huu Nguyen Cong, Chun-Ping Jen, Loc Do Quang, Trinh Chu Duc, Tung Thanh Bui, “*Novel Electrochemical Immunosensing Structure Based on a Functionalized Carbon Electrode with 11-MUA for NSE Protein Detection*”, (2023), International Conference on Health Science and Technology – ICHST Conference, IEEE Xplore (ISBN: 979-8-3503-1571-4), p1-4, <https://doi.org/10.1109/ICHST59286.2023.10565337>.
- [7] **Huynh Thi Thuy Linh**, Nguyen Dang Phu, Tran Nhu Chi, Do Quang Loc, Bui Thanh Tung, Tran Thi Thuy Ha and Chu Duc Trinh, “*An Effective Carbon Electrode Modification Process for Protein Detection Based on Gold Nanoparticles and Immunosensing Approach*”, (2023), International Workshop on Advanced Materials and Devices – IWAMD Conference, Thai Nguyen University Publishing House (ISBN: 978-604-350-270-1), p34-37.
- [8] **Linh Huynh Thi-Thuy**, Nha Vo Quang, Cuong Ngo Xuan, Thuan Nguyen Duy, Loc Do Quang, Tung Bui Thanh, Phu Nguyen Dang, Trinh Chu Duc, “*Application of Electrochemical Sensor System in Detecting White Spot Syndrome Virus: A Review*”, (2022), Asian Pacific Federation for Information Technology in Agriculture – APFITA Conference, Vietnam National University press, Hanoi, (ISBN: 978-604-9990-32-8), p230-238.

Danh mục này gồm 08 công trình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Peroni Felipe, “Global shrimp output set to increase 2% in 2025: Rabobank,” *S&P Global*, 2025. Accessed: Oct. 31, 2025. [Online]. Available: <https://www.spglobal.com/commodity-insights/en/news-research/latest-news/agriculture/011525-global-shrimp-output-set-to-increase-2-in-2025-rabobank>
- [2] ASC-AQUA.ORG, “Introducing shrimp: the globetrotter of seafood,” *Aquaculture Stewardship Council ASC*, 2025. Accessed: Oct. 31, 2025. [Online]. Available: <https://asc-aqua.org/learn-about-seafood-farming/farmed-shrimp/>
- [3] Mark P Zwart, Bui Thi Minh Dieu, Lia Hemerik, and Just M Vlak, “Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia,” *PLoS One*, vol. 5, no. 10, pp. 1–11, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013400.
- [4] Lotz J M, “Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture,” *World journal of microbiology and biotechnology*, vol. 13, pp. 405–413, 1997, doi: 10.1023/A:1018572132529.
- [5] C M Escobedo-Bonilla, V Alday-Sanz, M Wille, P Sorgeloos, M B Pensaert, and H J Nauwynck, “A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus,” *Journal of fish diseases*, vol. 31, no. 1, pp. 1–18, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x.
- [6] Peter J Walker and C V Mohan, “Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies,” *Reviews in aquaculture*, vol. 1, no. 2, pp. 125–154, 2009, doi: 10.1111/j.1753-5131.2009.01007.x.
- [7] Balakrishnan Pradeep, Praveen Rai, Seethappa A Mohan, Mudagandur S Shekhar, and Indrani Karunasagar, “Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus,” *Indian Journal of Virology*, vol. 23, no. 2, pp. 161–174, 2012, doi: 10.1007/s13337-012-0079-y.
- [8] Andrew P Shinn, J Pratoomyot, D Griffiths, T Q Trong, N Thanh Vu, P Jiravanichpaisal, and M Briggs, “Asian shrimp production and the economic costs of disease,” *Asian Fisheries Science*, vol. 31, pp. 29–58, 2018, doi: 10.33997/j.afs.2018.31.s1.003.
- [9] “Nghiên cứu vật mang virus đốm trắng (WSSV) gây bệnh trên tôm nuôi nước lợ và đề xuất giải pháp kiểm soát,” *Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia*, 2019. [Online]. Available: <https://vista.gov.vn/news/khoa-hoc-nong-nghiep/nguyen-cuu-vat-mang-virus-dom-trang-wssv-gay-benh-tren-tom-nuoi-nuoc-lo-va-de-xuat-giai-phap-kiem-soat-1331.html>
- [10] Dain Lee, Young-Bin Yu, Jae-Ho Choi, A-Hyun Jo, Su-Min Hong, Ju-Chan Kang, and Jun-Hwan Kim, “Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review,” *Viruses*, vol. 14, no. 585, pp. 1–62, 2022, doi: 10.3390/v14030585.
- [11] Vipul Panchal, Sushil Kumar, Shaikh Nausad Hossain, and Dileep Vasudevan, “Structure analysis of thymidylate synthase from white spot syndrome virus reveals WSSV-specific structural elements,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 167, pp. 1168–1175, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.071.
- [12] Lo Chu-Fang and Guang-Hsiung Kou, “Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review,” *Fish pathology*, vol. 33, no. 4, pp. 365–371, 1998, doi: 10.3147/jsfp.33.365.
- [13] Jeff Chia-Kai Hsu, Te-Ken Hsu, Jiji Kannan, Han-Ching Wang, Anchalee Tassanakajon, and Li-Li Chen, “Diagnostic performance of a Rapid Test Kit for white spot syndrome virus

- (WSSV),” *Aquaculture*, vol. 558, no. 738379, pp. 1–8, 2022, doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738379.
- [14] Alokesh Kumar Ghosh, “Functionality of probiotics on the resistance capacity of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV),” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 140, no. 108942, pp. 1–13, 2023, doi: 10.1016/j.fsi.2023.108942.
 - [15] Maeda Minoru, Jiraporn Kasornchandra, Toshiaki Itami, Nobutaka Suzuki, Oscar Hennig, Masakazu Kondo, Juan D Albaladejo, and Yukinori Takahashi, “Effect of various treatments on white spot syndrome virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand),” *Fish Pathology*, vol. 33, no. 4, pp. 381–387, 1998, doi: 10.3147/jsfp.33.381.
 - [16] Rout Namita, Sudhir Kumar, Shanmugam Jaganmohan, and Vadivel Murugan, “DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp,” *Vaccine*, vol. 25, no. 15, pp. 2778–2786, 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.056.
 - [17] Takahashi Yukinori, Kohei Fukuda, Masakazu Kondo, Anan Chongthaleong, Kazuto Nishi, Minoru Nishimura, Kosuke Ogata, Igarashi Shinya, Katsuyuki Takise, and Yasuyuki Fujishima, “Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp,” *Asian Aquaculture Magazine*, vol. 75, pp. 25–27, 2003.
 - [18] Fei Zhu, Wen-Hung Twan, Li-Chun Tseng, Shao-Hung Peng, and Jiang-Shiou Hwang, “First detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the mud shrimp *Austinoergia edulis* in Taiwan,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54837-0.
 - [19] Flegel Timothy W, Donald V Lightner, Chu Fang Lo, and Leigh Owens, “Shrimp disease control: past, present and future,” *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, vol. 505, pp. 355–378, 2008.
 - [20] Anusha Natarajan, K S Devi, Sudhakaran Raja, and Annamalai Senthil Kumar, “An elegant analysis of white spot syndrome virus using a graphene oxide/methylene blue based electrochemical immunosensor platform,” *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1038/srep46169.
 - [21] “Một số nét chính tình hình kinh tế – xã hội quý III và 9 tháng năm 2025,” *Tổng cục thống kê Việt Nam*, 2025. Accessed: Oct. 28, 2025. [Online]. Available: <https://www.nso.gov.vn/bai-top/2025/10/mot-so-net-chinh-tinh-hinh-kinh-te-xa-hoi-quy-iii-va-9-thang-nam-2025/>
 - [22] Thiều Văn Thành, “Bệnh đốm trắng do vi rút trên tôm nuôi nước lợ,” *Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Quảng Ninh*, 2015. [Online]. Available: <https://www.quangninh.gov.vn/So/sonongnghiep/Trang/ChiTietTinTuc.aspx?nid=4861>
 - [23] Thua Thien Hue Sub Department of Livestock Production and Animal Health, “Aquatic diseases situation report in Thua Thien Hue Province in 2019-2021,” Thua Thien Hue, Dec. 2021.
 - [24] Thua Thien Hue Sub Department of Livestock Production and Animal Health, “Aquatic diseases situation report in Thua Thien Hue Province in 2021,” Thua Thien Hue, Dec. 2021.
 - [25] Công Điền, “Thiệt hại hàng chục tỷ đồng vì tôm nuôi nhiễm bệnh,” *Nông nghiệp Việt Nam*, 2023. [Online]. Available: <https://nongnghiep.vn/thiet-hai-hang-chuc-ty-dong-vi-tom-nuoi-nhiem-benh-d368909.html>
 - [26] Arturo Sánchez-Paz, “White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern,” *Veterinary research*, vol. 41, no. 6, pp. 1–34, 2010, doi: 10.1051/vetres/2010015.

- [27] Wang Han Ching, Ikuo Hirono, Mary Beth Bacano Maningas, Kunlaya Somboonwiwat, and Grant Stentiford, "ICTV virus taxonomy profile: Nimaviridae," *Journal of General Virology*, vol. 100, no. 7, pp. 1053–1054, Jul. 2019, doi: 10.1099/jgv.0.001248.
- [28] Xuhua Tang, Jinlu Wu, J. Sivaraman, and Choy Leong Hew, "Crystal Structures of Major Envelope Proteins VP26 and VP28 from White Spot Syndrome Virus Shed Light on Their Evolutionary Relationship," *Journal of Virology*, vol. 81, no. 12, pp. 6709–6717, Jun. 2007, doi: 10.1128/jvi.02505-06.
- [29] Suchera Loyprasert-Thananimit, Akrapon Saleedang, Proespichaya Kanatharana, Panote Thavarungkul, and Wilaiwan Chotigeat, "Production of a polyclonal antibody to the VP26 nucleocapsid protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and its use as a biosensor," *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 6, no. 2, pp. 216–223, 2012, doi: 10.1007/s11705-012-1289-y.
- [30] Patil Rajreddy, K. M. Shankar, S. R. Krupesha Sharma, Amod Kulkarni, Prakash Patil, B. T. Naveen Kumar, and A. K. Sahoo, "Epitope analysis of white spot syndrome virus of *Penaeus monodon* by in vivo neutralization assay employing a panel of monoclonal antibodies," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 30, no. 4–5, pp. 1007–1013, 2011, doi: 10.1016/j.fsi.2011.01.023.
- [31] Wu Wenlin, Lei Wang, and Xiaobo Zhang, "Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection," *Virology*, vol. 332, no. 2, pp. 578–583, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.virol.2004.12.011.
- [32] Chang Yu Hsuan, Ramya Kumar, Tze Hann Ng, and Han Ching Wang, "What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish," *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 80, pp. 53–66, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.dci.2017.03.003.
- [33] Abu Salman Talukder, Nusrat Jahan Punom, Md Mostavi Enan Eshik, Mst Khadiza Begum, H M Rakibul Islam, Zakir Hossain, and Mohammad Shamsur Rahman, "Molecular identification of white spot syndrome virus (WSSV) and associated risk factors for white spot disease (WSD) prevalence in shrimp (*Penaeus monodon*) aquaculture in Bangladesh," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 179, no. 107535, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1016/j.jip.2021.107535.
- [34] Prabir Kumar Kulabhusan, Jyutika M Rajwade, Vimal Sugumar, Gani Tajju, A S Sahul Hameed, and Kishore M Paknikar, "Field-usable lateral flow immunoassay for the rapid detection of white spot syndrome virus (WSSV)," *PLoS One*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0169012.
- [35] Mariëlle C.W. Van Hulten, Jeroen Witteveldt, Marjolein Snippe, and Just M. Vlak, "White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp," *Virology*, vol. 285, no. 2, pp. 228–233, Jul. 2001, doi: 10.1006/viro.2001.0928.
- [36] Joseph A. Capobianco, Wei Heng Shih, Jiann Horng Leu, Grace Chu Fang Lo, and Wan Y. Shih, "Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate-lead titanate piezoelectric microcantilever sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 3, pp. 964–969, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.08.004.
- [37] Kenshin Takemura, Jun Satoh, Jirayu Boonyakida, Sungjo Park, Ankan Dutta Chowdhury, and Enoch Y Park, "Electrochemical detection of white spot syndrome virus with a silicone rubber disposable electrode composed of graphene quantum dots and gold nanoparticle-embedded polyaniline nanowires," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00712-4.

- [38] Trần Việt Tiên, “Phân biệt đốm trắng trên tôm do vi-rút, vi khuẩn và môi trường,” *UV-Việt Nam*, 2019. [Online]. Available: <https://uv-vietnam.com.vn/phan-biet-dom-trang-tren-tom-do-virut-vi-khuan-va-moi-truong>
- [39] Lightner D. V., “Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review,” *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 106, no. 1. pp. 110–130, Jan. 2011. doi: 10.1016/j.jip.2010.09.012.
- [40] Chu Fang Lo, Jiann-Horng Leu, Ching Hui Ho, Chau Huei Chen, Shao En Peng, You Tzung Chen, Chih Ming Chou, Pei Yan Yeh, Chang Jen Huang, and Hsin Yiu Chou, “Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction,” *Diseases of aquatic organisms*, vol. 25, no. 1–2, pp. 133–141, 1996, doi: 10.3354/dao025133.
- [41] L T Tan, S Soon, K L Lee, M Shariff, M D Hassan, and A R Omar, “Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction,” *Journal of fish diseases*, vol. 24, no. 6, pp. 315–323, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2761.2001.00286.x.
- [42] Chen Z. J., C. S. Wang, and H. H. Shih, “An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA,” *Journal of Fish Diseases*, vol. 25, no. 4, pp. 249–251, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00360.x.
- [43] Chaivisuthangkura Parin, Siwaporn Longyant, Sombat Rukpratanporn, Chutima Srisuk, Pattarin Sridulyakul, and Paisarn Sithigorngul, “Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein,” *Aquaculture*, vol. 299, no. 1–4, pp. 15–20, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.005.
- [44] Wang Yuzhen, Xiaohua Zhang, Li Yuan, Tao Xu, Yu Rao, Jia Li, and Heping Dai, “Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure-function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 372, no. 4, pp. 902–906, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.152.
- [45] Abcam, “Anti-White spot syndrome virus VP28 antibody,” *Abcam*, 2025. <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/white-spot-syndrome-virus-vp28-antibody-ab26935> (accessed Nov. 03, 2025).
- [46] Inchara U. B., R. P. Sathish, K. M. Shankar, P. B. Abhiman, and P. Prakash, “Evaluation of the Sensitivity of the Flow Through Assay for detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) using a cocktail of monoclonal antibodies,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 456, pp. 54–60, May 2018, doi: 10.1016/j.jim.2018.02.012.
- [47] Sithigorngul Weerawan, Sombat Rukpratanporn, Nilawan Pecharaburanin, Siwaporn Longyant, Parin Chaivisuthangkura, and Paisarn Sithigorngul, “A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp,” *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 72, no. 2, pp. 101–106, Oct. 2006, doi: 10.3354/dao072101.
- [48] Alan D. McNaught and Andrew Wilkinson, *Compendium of chemical terminology*, Version 2.3.3. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014. doi: 10.1351/goldbook.I033522016.
- [49] Rebecca L Caygill, G Eric Blair, and Paul A Millner, “A review on viral biosensors to detect human pathogens,” *Analytica chimica acta*, vol. 681, no. 1–2, pp. 8–15, 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.09.038.

- [50] Cooper Matthew A, “Label-free screening of bio-molecular interactions,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 377, pp. 834–842, 2003, doi: 10.1007/s00216-003-2111-y.
- [51] Gauglitz Günter, “Direct optical detection in bioanalysis: an update,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, pp. 2363–2372, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3904-4.
- [52] Kagan Kerman, Masaaki Kobayashi, and Eiichi Tamiya, “Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology,” *Measurement Science and Technology*, vol. 15, no. 2, pp. R1–R11, 2004, doi: 10.1088/0957-0233/15/2/R01.
- [53] Bastian E Rapp, Friederike J Gruhl, and Kerstin Länge, “Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, pp. 2403–2412, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3906-2.
- [54] Saluma Samanman, Proespichaya Kanatharana, Wilaiwan Chotigeat, Panchalika Deachamag, and Panote Thavarungkul, “Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water,” *Journal of virological methods*, vol. 173, no. 1, pp. 75–84, 2011, doi: 10.1016/j.jviromet.2011.01.010.
- [55] Kimmel Danielle W., Gabriel Leblanc, Mika E. Meschievitz, and David E. Cliffel, “Electrochemical sensors and biosensors,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 685–707, Jan. 17, 2012. doi: 10.1021/ac202878q.
- [56] Arduini Fabiana, Laura Micheli, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi, Silvia Piermarini, Francesco Ricci, and Giulia Volpe, “Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis,” *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 79. Elsevier B.V., pp. 114–126, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.032.
- [57] Ahmed Minhaz Uddin, Mohammad Mosharraf Hossain, and Eiichi Tamiya, “Electrochemical biosensors for medical and food applications,” *Electroanalysis*, vol. 20, no. 6. Wiley-VCH Verlag, pp. 616–626, 2008. doi: 10.1002/elan.200704121.
- [58] Kokkinos Christos, Anastasios Economou, and Mamas I. Prodromidis, “Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies,” *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 79. Elsevier B.V., pp. 88–105, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2015.11.020.
- [59] Đinh Thương Vân, “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng (Monoclonal Antibody) để chẩn đoán nhanh bệnh virus trên tôm nuôi,” *Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2011. <https://vast.gov.vn/tin-chi-tiet/-/chi-tiet/nghien-cuu-ung-dung-cong-nghe-san-xuat-khang-the-%C4%91on-dong-monoclonal-antibody-%C4%91e-chan-%C4%91oan-nhanh-benh-virus-tren-tom-nuoi-2887-437.html> (accessed Nov. 02, 2025).
- [60] Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Vân Anh, and Phạm Kiên Cường, “Nghiên cứu chế tạo chế phẩm probiotic dạng bào tử *Bacillus subtilis* tái tổ hợp để phòng virus gây bệnh đốm trắng ở tôm,” *HỆ THỐNG THÔNG TIN QUỐC GIA VỀ KHOA HỌC, CÔNG NGHỆ VÀ ĐỔI MỚI SÁNG TẠO*, 2016. Accessed: Jan. 21, 2026. [Online]. Available: <https://sti.vista.gov.vn/projects/udnv/nghien-cuu-che-tao-che-pham-probiotic-dang-bao-tu-bacillus-subtilis-tai-to-hop-de-phong-virus-gay-benh-dom-trang-o-tom-685.html>
- [61] Yaziji Hadi, Clive R Taylor, Neal S Goldstein, David J Dabbs, Elizabeth H Hammond, Bryan Hewlett, Alton D Floyd, Todd S Barry, Alvn W Martin, Sunil Badve, Frederick Baehner, Richard W Cartun, Richard N Eisen, Paul E Swanson, Stephen M Hewitt, Mogen Vyberg, and David G Hicks, “Consensus Recommendations on Estrogen Receptor Testing

- in Breast Cancer By Immunohistochemistry,” *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, vol. 16, no. 6, pp. 513–520, 2008, doi: 10.1097/PAI.0b013e31818a9d3a.
- [62] Veskimäe K., S. Staff, A. Grönholm, M. Pesu, M. Laaksonen, M. Nykter, J. Isola, and J. Mäenpää, “Assessment of PARP protein expression in epithelial ovarian cancer by ELISA pharmacodynamic assay and immunohistochemistry,” *Tumor Biology*, vol. 37, no. 9, pp. 11991–11999, Sep. 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5062-6.
 - [63] Schmitt Manfred, Alexandra S. Sturmheit, Anita Welk, Christel Schnelldorfer, and Nadia Harbeck, “Procedures for the Quantitative Protein Determination of Urokinase and Its Inhibitor, PAI-1, in Human Breast Cancer Tissue Extracts by ELISA,” in *Methods in Molecular Medicine*, vol. 120, 2006, pp. 245–265. doi: 10.1385/1-59259-969-9:245.
 - [64] Grimwade Lizz, Emma Gudgin, David Bloxham, Mike A. Scott, and Wendy N. Erber, “PML protein analysis using imaging flow cytometry,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 64, no. 5, pp. 447–450, May 2011, doi: 10.1136/jcp.2010.085662.
 - [65] Kuo Ho Chang, Kuang Che Kuo, Pin Xian Du, Batuhan Birol Keskin, Wen Yu Su, Tzong Shiann Ho, Pei Shan Tsai, Chi Ho Pau, Hsi Chang Shih, Ying Hsien Huang, Ken Pen Weng, and Guan Da Syu, “Profiling Humoral Immunity After Mixing and Matching COVID-19 Vaccines Using SARS-CoV-2 Variant Protein Microarrays,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 22, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100507.
 - [66] Serrano V M, I S P Silva, A R Cardoso, and M G F Sales, “Carbon electrodes with gold nanoparticles for the electrochemical detection of miRNA 21-5p,” *Chemosensors*, 2022, doi: 10.3390/chemosensors10050189.
 - [67] Kim Hye Jin, Dongsung Park, Yejin Park, Dae-Hyeong Kim, and Jinsik Kim, “Electric-Field-Mediated In-Sensor Alignment of Antibody’s Orientation to Enhance the Antibody–Antigen Binding for Ultrahigh Sensitivity Sensors,” *Nano Letters*, vol. 22, no. 16, pp. 6537–6544, 2022, doi: 10.1021/acs.nanolett.2c01584.
 - [68] Albareda-Sirvent Miquel, Arben Merkoci, and Salvador Alegret, “Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 69, no. 1–2, pp. 153–163, 2000, doi: 10.1016/S0925-4005(00)00536-0.
 - [69] Holford Timothy R J, Frank Davis, and Séamus P J Higson, “Recent trends in antibody based sensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 34, no. 1, pp. 12–24, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2011.10.023.
 - [70] Olkhov Rouslan V and Andrew M Shaw, “Label-free antibody–antigen binding detection by optical sensor array based on surface-synthesized gold nanoparticles,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 8, pp. 1298–1302, 2008, doi: 10.1016/j.bios.2007.11.023.
 - [71] Sadrjavadi Komail, Mojtaba Taran, Ali Fattahi, and Alireza Khoshroo, “A microelectrode system for simple measurement of neuron specific enolase with photolithography technique,” *Microchemical Journal*, vol. 182, p. 107889, 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107889.
 - [72] Ahmed Minhaz Uddin, Mohammad Mosharraf Hossain, Mohammadali Safavieh, Yen Lu Wong, Ibrahim Abd Rahman, Mohammed Zourob, and Eiichi Tamiya, “Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes,” *Critical reviews in biotechnology*, vol. 36, no. 3, pp. 495–505, 2016, doi: 10.3109/07388551.2014.992387.
 - [73] Wong Pooi See, Sheila Nathan, and Lee Yook Heng, “A disposable copper (II) ion biosensor based on self-assembly of L-cysteine on gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode,” *Journal of Sensors*, vol. 2011, pp. 1–5, 2011, doi: 10.1155/2011/230535.

- [74] Kanokwan Charoenkitamorn, Orawon Chailapakul, and Weena Siangproh, "Development of gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for the analysis of thiram, disulfiram and their derivative in food using ultra-high performance liquid chromatography," *Talanta*, vol. 132, pp. 416–423, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.020.
- [75] Gotti Guillaume, Katia Fajerweg, David Evrard, and Pierre Gros, "Electrodeposited gold nanoparticles on glassy carbon: Correlation between nanoparticles characteristics and oxygen reduction kinetics in neutral media," *Electrochimica Acta*, vol. 128, pp. 412–419, 2014, doi: 10.1016/j.electacta.2013.10.172.
- [76] Teddy Hezard, Katia Fajerweg, David Evrard, Vincent Collière, Philippe Behra, and Pierre Gros, "Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg (II) trace analysis," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 664, pp. 46–52, 2012, doi: 10.1016/j.jelechem.2011.10.014.
- [77] Fan Yan, Juntao Liu, Yang Wang, Jinping Luo, Huiren Xu, Shengwei Xu, and Xinxia Cai, "A wireless point-of-care testing system for the detection of neuron-specific enolase with microfluidic paper-based analytical devices," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 95, pp. 60–66, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2017.04.003.
- [78] Afkhami Abbas, Pegah Hashemi, Hasan Bagheri, Jafar Salimian, Ali Ahmadi, and Tayyebeh Madrakian, "Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype A using Au nanoparticles/graphene-chitosan composite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 93, pp. 124–131, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.059.
- [79] Welch Nicholas G., Judith A. Scoble, Benjamin W. Muir, and Paul J. Pigram, "Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review)," *Biointerphases*, vol. 12, no. 2, Jun. 2017, doi: 10.1116/1.4978435.
- [80] Crivianu-Gaita Victor and Michael Thompson, "Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 70. Elsevier Ltd, pp. 167–180, Aug. 05, 2015. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.032.
- [81] Nguyễn Phước Thuận, Đỗ Hiếu Liêm, and Huỳnh Thị Bạch Yến, *Giáo trình sinh hóa học phần II: Trao đổi chất và năng lượng*. NXB Nông nghiệp, 2007.
- [82] Chen Shengfu, Lingyun Liu, Jian Zhou, and Shaoyi Jiang, "Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayers," *Langmuir*, vol. 19, no. 7, pp. 2859–2864, Apr. 2003, doi: 10.1021/la026498v.
- [83] Love J. Christopher, Lara A. Estroff, Jennah K. Kriebel, Ralph G. Nuzzo, and George M. Whitesides, "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology," *Chemical Reviews*, vol. 105, no. 4, pp. 1103–1169, Apr. 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [84] Kim Dong Chung and Dae Joon Kang, "Molecular recognition and specific interactions for biosensing applications," *Sensors*, vol. 8, no. 10, pp. 6605–6641, 2008, doi: 10.3390/s8106605.
- [85] Ignat Teodora, Mihaela Miu, Irina Kleps, Adina Bragaru, Monica Simion, and Mihai Danila, "Electrochemical characterization of BSA/11-mercaptoundecanoic acid on Au electrode," *Materials Science and Engineering: B*, vol. 169, no. 1–3, pp. 55–61, 2010, doi: 10.1016/j.mseb.2009.11.021.
- [86] Ahmad Azrilawani and Eric Moore, "Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrodes for detection of

- benzo [a] pyrene in water,” *Analyst*, vol. 137, no. 24, pp. 5839–5844, 2012, doi: 10.1039/C2AN35236B.
- [87] Chaki Nirmalya K and K Vijayamohanan, “Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, no. 1–2, pp. 1–12, 2002, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00277-9.
- [88] Arya Sunil K., Pratima R. Solanki, Monika Datta, and Bansi D. Malhotra, “Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 9, pp. 2810–2817, May 2009, doi: 10.1016/j.bios.2009.02.008.
- [89] Samanta Debasis and Amitabha Sarkar, “Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: Methods and sensor applications,” *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 5, pp. 2567–2592, Apr. 2011, doi: 10.1039/c0cs00056f.
- [90] Wink Th, S J Van Zuilen, A Bult, and W P Van Bennekom, “Self-assembled monolayers for biosensors,” *Analyst*, vol. 122, no. 4, pp. 43R–50R, 1997, doi: 10.1039/A606964I.
- [91] Moccelini Sally Katiuce, Suellen Cadorin Fernandes, and Iolanda Cruz Vieira, “Bean sprout peroxidase biosensor based on l-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 133, no. 2, pp. 364–369, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.snb.2008.02.039.
- [92] Wang Sheng-Fu, Dan Du, and Qi-Chao Zou, “Electrochemical behavior of epinephrine at L-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode,” *Talanta*, vol. 57, pp. 687–692, 2002, doi: 10.1016/S0039-9140(02)00072-3.
- [93] Arrigan Damien W.M. and Loïc Le Bihan, “A study of L-cysteine adsorption on gold via electrochemical desorption and copper(II) ion complexation,” *Analyst*, vol. 124, no. 11, pp. 1645–1649, 1999, doi: 10.1039/a905370k.
- [94] Wang Wenjing, Zhijian Yi, Qiongxin Liang, Junjie Zhen, Rui Wang, Mei Li, Lingwen Zeng, and Yongfang Li, “In Situ Deposition of Gold Nanoparticles and L-Cysteine on Screen-Printed Carbon Electrode for Rapid Electrochemical Determination of As(III) in Water and Tea,” *Biosensors*, vol. 13, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/bios13010130.
- [95] Yang Wenrong, J Justin Gooding, and D Brynn Hibbert, “Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 516, pp. 10–16, 2001, doi: 10.1016/S0022-0728(01)00649-0.
- [96] Aydın Elif Burcu, Muhammet Aydın, and Mustafa Kemal Sezgintürk, “Highly selective and sensitive sandwich immunosensor platform modified with MUA-capped GNPs for detection of spike Receptor Binding Domain protein: A precious marker of COVID 19 infection,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 345, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130355.
- [97] S J Xia and V I Birss, “A multi-technique study of compact and hydrous Au oxide growth in 0.1 M sulfuric acid solutions,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 500, no. 1–2, pp. 562–573, 2001, doi: 10.1016/S0022-0728(00)00415-0.
- [98] Tang Yue and Wenlong Cheng, “Nanoparticle-modified electrode with size- and shape-dependent electrocatalytic activities,” *Langmuir*, vol. 29, no. 9, pp. 3125–3132, Mar. 2013, doi: 10.1021/la304616k.
- [99] da Silva Everson T.S.G., Dênio E.P. Souto, José T.C. Barragan, Juliana de F. Giarola, Ana C.M. de Moraes, and Lauro T. Kubota, “Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends,” *ChemElectroChem*, vol. 4, no. 4. Wiley-VCH Verlag, pp. 778–794, Apr. 01, 2017. doi: 10.1002/celec.201600758.

- [100] Lazanas Alexandros Ch and Mamas I. Prodromidis, “Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial,” *ACS Measurement Science Au*, vol. 3, no. 3. American Chemical Society, pp. 162–193, Jun. 21, 2023. doi: 10.1021/acsmesuresciau.2c00070.
- [101] Piedras Jessica, Rocio B. Dominguez, and Juan Manuel Gutiérrez, “Determination of uric acid in artificial saliva with compact AMP3291 reader and au nanoparticles modified electrode,” *Chemosensors*, vol. 9, no. 4, 2021, doi: 10.3390/chemosensors9040073.
- [102] Simões FABIO RUIZ and Miguel Gustavo Xavier, “Electrochemical sensors,” *Nanoscience and its Applications*, pp. 155–178, 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5.
- [103] Lichtenecker Maisson, Maria Cristina, Carpes Marchesan, Andréia Dos, Santos Sachete, and Fábio Diniz Rossi, “Reference Curriculum for IoT Applied to Anything: A Proposal,” *Literacy Information and Computer Education Journal*, vol. 11, no. 11, pp. 3403–3410, 2020, doi: 10.20533/licej.2040.2589.2020.0447.
- [104] Minh Le Quang Nhat, Tri Ho Minh, Thang Dang Van, Nhan Nguyen Thanh Thanh, Suu Nguyen Cuu, and Linh Huynh Thi Thuy, “Application of Internet of Things and computer vision in building intelligent light model using solar energy,” in *Proceedings - 2022 9th NAFOSTED Conference on Information and Computer Science, NICS 2022*, 2022, pp. 361–366. doi: 10.1109/NICS56915.2022.10013476.
- [105] Stolpe Marco, “The Internet of Things: Opportunities and Challenges for Distributed Data Analysis,” *Acm Sigkdd Explorations Newsletter*, vol. 18, no. 1, pp. 15–34, 2016, doi: 10.1145/2980765.2980768.
- [106] Gil Reiter, “Wireless connectivity for the Internet of Things Network,” *Texas Instruments*, 2014.
- [107] Perwej Yusuf, Majzoob K Omer, Osama E Sheta, Hani M Ali Harb, Mohmed S Adrees, and Assistant Professor, “The Future of Internet of Things (IoT) and Its Empowering Technology,” 2019. [Online]. Available: <http://ijesc.org/>
- [108] Mishra Biswajeeban and Attila Kertesz, “The use of MQTT in M2M and IoT systems: A survey,” *IEEE Access*, vol. 8, pp. 201071–201086, 2020, doi: 10.1109/ACCESS.2020.3035849.
- [109] Soni Dipa and Ashwin Makwana, “A Survey on MQTT: a Protocol of Internet of Things (IoT),” *International Conference on Telecommunication, Power Analysis and Computing Techniques*, pp. 173–177, 2017, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/316018571>
- [110] Light Roger A, “Mosquitto: server and client implementation of the MQTT protocol,” *The Journal of Open Source Software*, vol. 2, no. 13, p. 265, May 2017, doi: 10.21105/joss.00265.
- [111] Alex Peroff, “What is a Potentiostat and how does it work?,” *Pine research*, 2024. [Online]. Available: <https://pineresearch.com/support-article/what-is-a-potentiostat-and-how-does-it-work/>
- [112] ArduinoKarl Söderby and Jacob Hylén, “Getting Started with Arduino IDE,” <https://docs.arduino.cc/software/ide-v2/tutorials/getting-started-ide-v2/>, Jan. 17, 2024.
- [113] Anderson Erik W, Gilbert A Preston, and Claudio T Silva, “Using Python for Signal Processing and Visualization,” *Computing in science & engineering*, vol. 12, no. 4, pp. 90–95, 2010, doi: 10.1109/MCSE.2010.91.
- [114] Kong Siu-Cheung and Harold Abelson, *Computational Thinking Education*. Springer Nature, 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6528-7>.

- [115] Begel Andrew and Eric Klopfer, “StarLogo TNG: An Introduction to Game Development,” *Journal of E-Learning*, pp. 1–15, 2004.
- [116] Resnick Mitchel, John Maloney, Andrés Monroy-Hernández, Natalie Rusk, Evelyn Eastmond, Karen Brennan, Amon Millner, Eric Rosenbaum, Jay Silver, Brian Silverman, and Yasmin Kafai, “Scratch: Programming for all,” *Communications of the ACM*, vol. 52, no. 11, pp. 60–67, Nov. 2009, doi: 10.1145/1592761.1592779.
- [117] Maloney John, Mitchel Resnick, Natalie Rusk, Brian Silverman, and Evelyn Eastmond, “The scratch programming language and environment,” *ACM Transactions on Computing Education*, vol. 10, no. 4, Nov. 2010, doi: 10.1145/1868358.1868363.
- [118] Pokress Shaileen Crawford and José Juan Dominguez Veiga, “MIT App Inventor: Enabling Personal Mobile Computing,” Oct. 2013. doi: 10.48550/arXiv.1310.2830.
- [119] Jen Chun Ping, Tamara G. Amstislavskaya, Chen Chi Kuo, and Yu Hung Chen, “Protein preconcentration using nanofractures generated by nanoparticle-assisted electric breakdown at junction gaps,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7, Jul. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0102050.
- [120] Siegenthaler James R., Breanna C. Gushiken, Daniel F. Hill, Stephen L. Cowen, and Michael L. Heien, “Moving Fast-Scan Cyclic Voltammetry toward FDA Compliance with Capacitive Decoupling Patient Protection,” *ACS Sensors*, vol. 5, no. 7, pp. 1890–1899, Jul. 2020, doi: 10.1021/acssensors.9b02249.
- [121] Stephen Butterworth, “On the Theory of Filter Amplifiers,” *The Wireless Engineer*, vol. 7, no. 6, pp. 536–541, 1930.
- [122] Gauglitz Günter, “Analytical evaluation of sensor measurements,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, no. 1, pp. 5–13, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00216-017-0624-z.
- [123] Elgrishi Noémie, Kelley J. Rountree, Brian D. McCarthy, Eric S. Rountree, Thomas T. Eisenhart, and Jillian L. Dempsey, “A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry,” *Journal of Chemical Education*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [124] Idegami Koutarou, Miyuki Chikae, Kagan Kerman, Naoki Nagatani, Teruko Yuhi, Tatsuro Endo, and Eiichi Tamiya, “Gold nanoparticle-based redox signal enhancement for sensitive detection of human chorionic gonadotropin hormone,” *Electroanalysis*, vol. 20, no. 1, pp. 14–21, 2008, doi: 10.1002/elan.200704011.
- [125] Chikae Miyuki, Koutarou Idegami, Kagan Kerman, Naoki Nagatani, Mitsuyoshi Ishikawa, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya, “Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode,” *Electrochemistry Communications*, vol. 8, no. 8, pp. 1375–1380, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.elecom.2006.06.019.
- [126] Dawan Supaporn, Rodtichoti Wannapob, Proespichaya Kanatharana, Warakorn Limbut, Apon Numnuam, Saluma Samanman, and Panote Thavarungkul, “One-step porous gold fabricated electrode for electrochemical impedance spectroscopy immunosensor detection,” *Electrochimica Acta*, vol. 111, pp. 374–383, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2013.08.012.
- [127] Ahmad Azrilawani, Lee Pui Kee, and Noor Sheryna Jusoh, “A Comparative Study of Thiols Self-Assembled Monolayers on Gold Electrode,” *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 24, no. 6, pp. 2152–2158, 2016, doi: 10.5829/idosi.mejsr.2016.24.06.23658.
- [128] Khamcharoen Wisarut, Charles S. Henry, and Weena Siangproh, “A novel L-cysteine sensor using in-situ electropolymerization of L-cysteine: Potential to simple and selective detection,” *Talanta*, vol. 237, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122983.

- [129] Marques De Oliveira Rodrigo, Jacqueline Ferreira, Marcos J.L. Santos, Roberto M. Faria, and Osvaldo N. Oliveira, "Probing the functionalization of gold surfaces and protein adsorption by PM-IRRAS," *ChemPhysChem*, vol. 12, no. 9, pp. 1736–1740, Jun. 2011, doi: 10.1002/cphc.201100080.
- [130] Vargis Vidhu Sara, Suneesh Punathil Vasu, R. Jyothi Sree, Bipin Nair, and Satheesh Babu Thekkedath Gopalakrishnan, "Peroxidase Labeled Antibody Conjugated Gold Nanoparticles for Ultrasensitive Voltammetric Immunosensing," *IEEE Sensors Journal*, vol. 20, no. 3, pp. 1142–1149, Feb. 2020, doi: 10.1109/JSEN.2019.2946311.
- [131] Ulman Abraham, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers," *Chemical Reviews*, vol. 96, no. 4, pp. 1533–1554, 1996, doi: <https://doi.org/10.1021/cr9502357>.
- [132] Ding Shinn Jyh, Bin Wha Chang, Ching Chou Wu, Min Feng Lai, and Hsien Chang Chang, "Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes," *Analytica Chimica Acta*, vol. 554, no. 1–2, pp. 43–51, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.aca.2005.08.046.
- [133] Nádia F.D. Silva Cláudio M.R. Almeida, Júlia M.C.S. Magalhães, Maria P. Gonçalves, Cristina Freire, Cristina Delerue-Matos, "Development of a disposable paper-based potentiometric immunosensor for real-time detection of a foodborne pathogen," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 141, p. 111317, Sep. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111317>.
- [134] Silva Nádia F D, Júlia M C S Magalhães, M Fátima Barroso, Teresa Oliva-Teles, Cristina Freire, and Cristina Delerue-Matos, "In Situ Formation of Gold Nanoparticles in Polymer Inclusion Membrane: Application as Platform in a Label-Free Potentiometric Immunosensor for Salmonella Typhimurium Detection," *Talanta*, vol. 194, pp. 134–142, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.024>.
- [135] Atabay Saiedeh Agh, Hossein Ahmadzadeh, Parviz Norouzi, Somayeh Dianat, and Kheibar Dashtian, "Development of a sensitive antibody-based label-free electrochemical immunosensors for breast cancer diagnosis," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 48, Jun. 2025, doi: 10.1016/j.sbsr.2025.100793.
- [136] Xiao Yinghong, Chang Ming Li, and Yingshuai Liu, "Electrochemical impedance characterization of antibody-antigen interaction with signal amplification based on polypyrrole-streptavidin," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 12, pp. 3161–3166, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.bios.2007.02.008.
- [137] Zhong Tao, Zuhua Jiang, Yuxuan Xing, Sicong Jiang, Yuan Wu, and Shiyuan Yao, "Electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for the detection of creatine kinase as a cardiac marker," *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 19, no. 11, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.ijoes.2024.100821.
- [138] L Komsijska and G Staikov, "Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄]⁻," *Electrochimica Acta*, vol. 54, no. 2, pp. 168–172, 2008, doi: 10.1016/j.electacta.2008.08.013.
- [139] Germano Tremiliosi-Filho, L H Dall'Antonia, and G Jerkiewicz, "Growth of surface oxides on gold electrodes under well-defined potential, time and temperature conditions," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 578, no. 1, pp. 1–8, 2005, doi: 10.1016/j.jelechem.2004.12.007.
- [140] Wei Zhang, Ahmet Deniz Bas, Edward Ghali, and CHOI Yeonuk, "Passive behavior of gold in sulfuric acid medium," *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 25, no. 6, pp. 2037–2046, 2015, doi: 10.1016/S1003-6326(15)63813-4.

- [141] S. Kumar, J. Aaron, and K. Sokolov, "Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 2, pp. 314–320, Feb. 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.1.
- [142] P. Topolovsek, F. Lamberti, T. Gatti, A. Cito, J. M. Ball, E. Menna, C. Gadermaier, and A. Petrozza, "Functionalization of transparent conductive oxide electrode for TiO₂-free perovskite solar cells," *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 5, no. 23, pp. 11882–11893, 2017, doi: 10.1039/c7ta02405c.
- [143] Yun Lei, Hongyu Chen, Heping Dai, Zhaorui Zeng, Yi Lin, Feimeng Zhou, and Daiwen Pang, "Electroless-plated gold films for sensitive surface plasmon resonance detection of white spot syndrome virus," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 7, pp. 1200–1207, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.bios.2007.10.004.
- [144] Linh Huynh Thi Thuy, Phu Nguyen Dang, Hung Cao, Hung Anh Nguyen, Jung-Chih Chiao, Chun-Ping Jen, Loc Do Quang, Trinh Chu Duc, and Tung Bui Thanh, "A Highly Sensitive Immunosensor for White Spot Syndrome Virus (WSSV) Envelope Protein VP28 Detection Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy Technique," 2023. doi: 10.1109/SENSORS56945.2023.10325273.
- [145] Yun Young Ran, Hyoung Jun Kim, and Sung Yang, "Molecularly imprinted poly(o-aminophenol)-based electrochemical sensor for the quantitative detection of a VP28 biomarker for white spot syndrome virus," *Sensors and Actuators Reports*, vol. 10, Dec. 2025, doi: 10.1016/j.snr.2025.100375.
- [146] Mattei Giorgio, Ludovica Cacopardo, and Arti Ahluwalia, "Engineering gels with time-evolving viscoelasticity," *Materials*, vol. 13, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.3390/ma13020438.
- [147] Barbosa Oveimar, Claudia Ortiz, Ángel Berenguer-Murcia, Rodrigo Torres, Rafael C. Rodrigues, and Roberto Fernandez-Lafuente, "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization," *RSC Advances*, vol. 4, no. 4, pp. 1583–1600, 2014. doi: 10.1039/c3ra45991h.
- [148] Feliciano-Ramos Ileana, Miguel Caban-Acevedo, M. Aulice Scibioh, and Carlos R. Cabrera, "Self-assembled monolayers of l-cysteine on palladium electrodes," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 650, no. 1, pp. 98–104, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.jelechem.2010.09.001.
- [149] Qingwen Li, Gao Hong, Wang Yiming, Luo Guoan, and Ma Jie, "Studies on Self-Assembly Monolayers of Cysteine on Gold by XPS, QCM, and Electrochemical Techniques," *Electroanalysis*, vol. 13, no. 16, pp. 1342–1346, 2001, doi: 10.1002/1521-4109(200111)13:16%3C1342::AID-ELAN1342%3E3.0.CO;2-B.
- [150] Hend S Magar, Rabeay Y A Hassan, and Ashok Mulchandani, "Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications," *Sensors*, vol. 21, no. 19, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/s21196578.
- [151] Sangili Arumugam, Thangapandi Kalyani, Shen Ming Chen, Kokilavani Rajendran, and Saikat Kumar Jana, "Label-free electrochemical immunosensor based on L-cysteine-functionalized AuNP on reduced graphene oxide for the detection of dengue virus E-protein in dengue blood serum," *Composites Part B: Engineering*, vol. 238, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.compositesb.2022.109876.
- [152] Lin Peter, Tsung Liang Chuang, Paul Z. Chen, Chii Wann Lin, and Frank X. Gu, "Low-Fouling Characteristics of Ultrathin Zwitterionic Cysteine SAMs," *Langmuir*, vol. 35, no. 5, pp. 1756–1767, Feb. 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b01525.

- [153] Han Jing, Ying Zhuo, Ya Qin Chai, Ya Li Yuan, and Ruo Yuan, “Novel electrochemical catalysis as signal amplified strategy for label-free detection of neuron-specific enolase,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 31, no. 1, pp. 399–405, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.bios.2011.10.055.

1. PHỤ LỤC 1 - CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC PHÁT HIỆN PROTEIN BSA-FITC SỬ DỤNG SAM L-CYSTEINE

Trong nghiên cứu này, hai loại SAM gồm 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) và L-Cysteine được khảo sát nhằm đánh giá ảnh hưởng của vật liệu SAM đến khả năng cố định kháng thể và hiệu quả truyền tín hiệu điện hoá của cảm biến miễn dịch. Với SAM L-Cysteine, kháng thể được cố định thông qua hai cơ chế: (i) liên kết chéo bằng Glutaraldehyde, và (ii) liên kết cộng hoá trị thông qua hoạt hoá nhóm cacboxyl bằng EDC/NHS. Việc so sánh các loại SAM và cơ chế cố định kháng thể giúp xác định lớp nền thích hợp nhất cho cảm biến, đảm bảo độ ổn định cao, khả năng cố định tốt kháng thể lên bề mặt cảm biến và hiệu suất nhận biết sinh học.

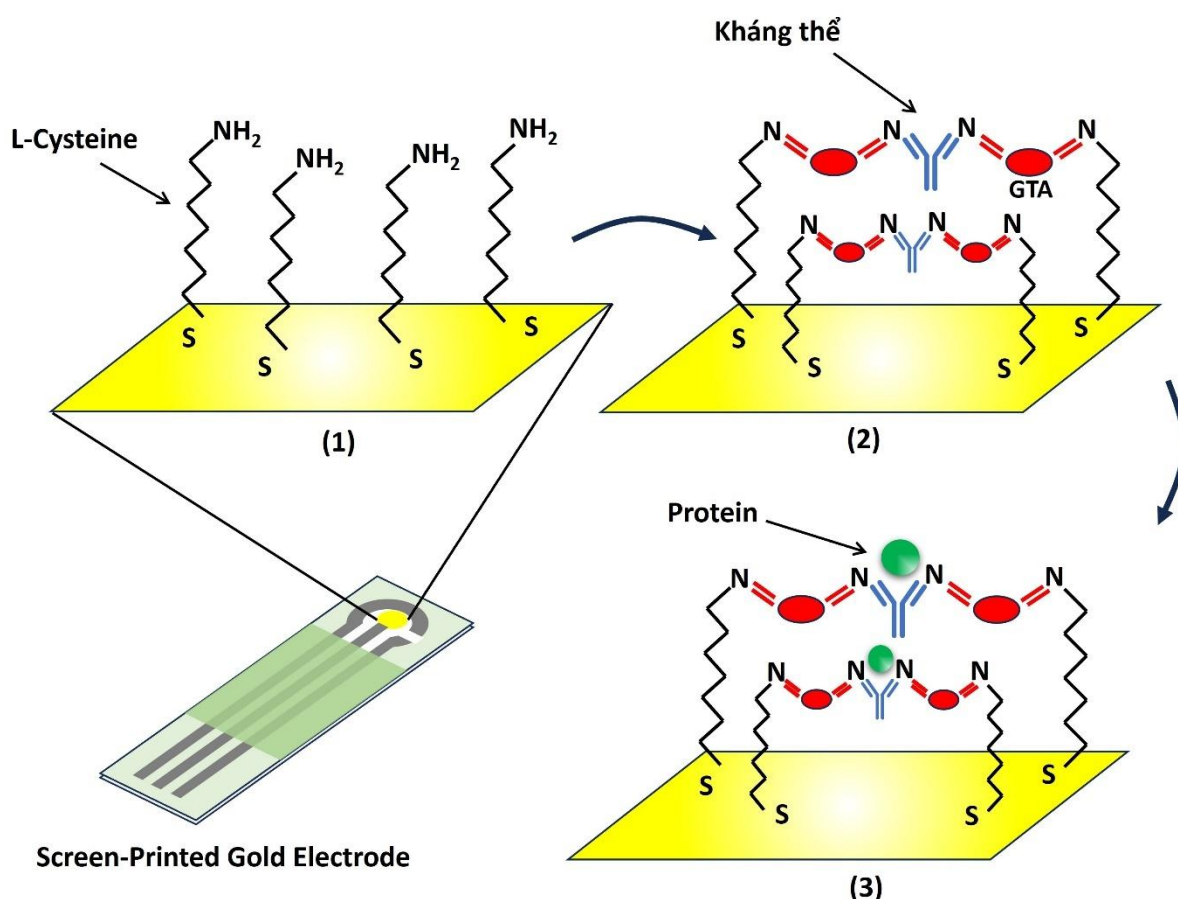
P1.1. Cố định kháng thể thông qua liên kết chéo với SAM L-Cysteine sử dụng Glutaraldehyde

Cảm biến miễn dịch sử dụng L-Cysteine làm SAM đã được phát triển để phát hiện protein mục tiêu, sử dụng quy trình ba bước đơn giản. Trong bước đầu tiên, SAM được hình thành trên bề mặt điện cực vàng sử dụng axit (R)-2-Amino-3-mercaptopropionic, L-Cysteine. Bước thứ hai kháng thể anti-BSA hoạt động như một đầu thu sinh học, được cố định trên bề mặt điện cực bằng liên kết chéo giữa các nhóm amin của nó với các nhóm amin của L-Cysteine bằng cách sử dụng Glutaraldehyde (GTA) [146], [147]. Tương ứng với mỗi loại đầu thu sinh học, chỉ có thể ghép nối với một mục tiêu đặc hiệu, do đó việc cố định đầu thu sinh học cũng là một bước quan trọng, đặc trưng cho các ứng dụng cảm biến và chẩn đoán khác nhau. Bước thứ ba là bước phát hiện BSA-FITC ở các nồng độ khác nhau, bằng cách quan sát sự gia tăng tín hiệu quang do liên kết đặc hiệu của kháng thể kháng BSA (anti-BSA) và protein mục tiêu (BSA-FITC), tương ứng với mức tăng nồng độ BSA-FITC trong khoảng từ 0,5 μM đến 8,0 μM . Kết hợp với những thay đổi rõ ràng về tín hiệu điện CV, SWV và EIS, sự hình thành các đơn lớp trên bề mặt điện cực và tín hiệu phát hiện của protein BSA-FITC đã được xác nhận.

P1.1.1. Hoá chất và thiết bị

Hóa chất, điện cực và thiết bị sử dụng trong quy trình này tương tự như đã trình bày ở mục 3.2.1 *Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC*. Glutaraldehyde 50% của hãng Sigma–Aldrich, Hoa Kỳ, được sử dụng làm tác nhân tạo liên kết chéo giữa các nhóm amin (-NH_2), giúp cố định kháng thể lên bề mặt điện cực vàng phủ lớp SAM L-Cysteine, thay thế cho phương pháp hoạt hoá bằng EDC/NHS. Hình 3.2 mô tả kết nối của thiết bị đo PalmSens4 với điện cực SPAuE và phần mềm PS Trace 5.9 trên máy tính.

P1.1.2. Quy trình chức năng hoá điện cực



Hình P1.1. Sơ đồ quy trình đề xuất: Bước (1) Hình thành SAM; Bước (2) Cố định kháng thể; Bước (3) Bắt giữ protein.

Quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein BSA-FITC sử dụng SAM L-Cysteine được thể hiện trên Hình P1.1.

- Bước 1: Hình thành SAM.

Ở bước 1, SAM L-Cysteine được hình thành trên bề mặt điện cực làm việc của điện cực SPAuE. Để thực hiện bước này, điện cực được ngâm qua đêm trong dung dịch L-Cysteine 10 mM pha trong PBS 1X, ở nhiệt độ phòng. Sau đó điện cực được làm sạch và ký hiệu SPAuE/SAM.

- Bước 2: Cố định kháng thể.

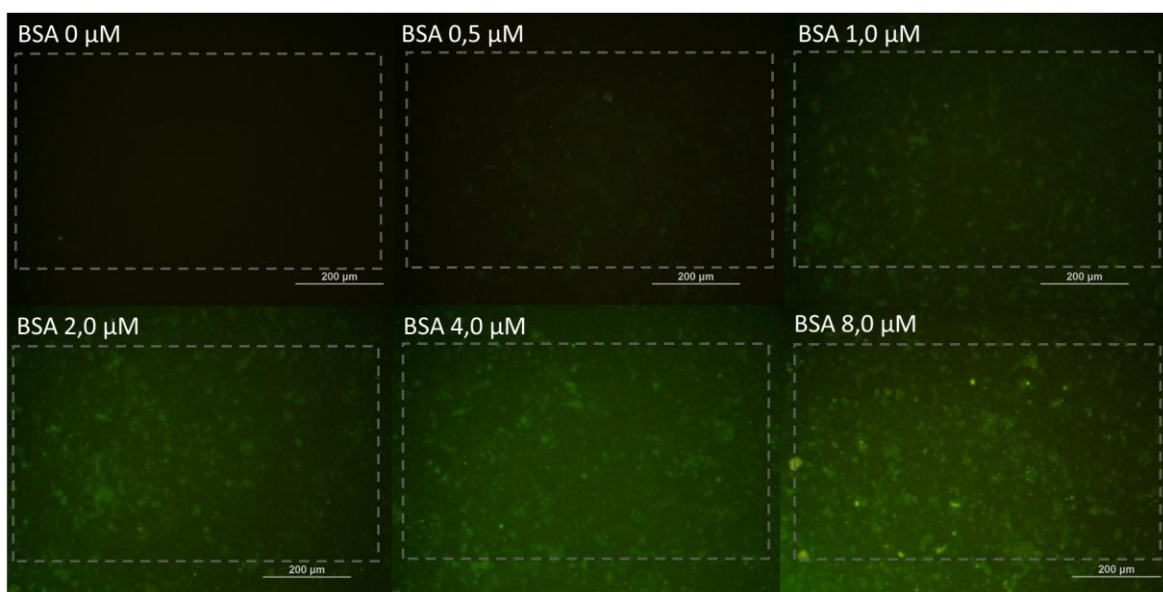
Chuẩn bị dung dịch gồm anti-BSA ở nồng độ 15 μM và glutaraldehyde ở nồng độ 5%, pha trong PBS 1X ở tỷ lệ thể tích 1:1. Sau đó nhỏ 3 μL dung dịch này lên bề mặt điện cực làm việc của điện cực SPAuE/SAM và ủ trong 2 giờ ở 4°C. Trong quá trình ủ, Glutaraldehyde tạo liên kết chéo giữa các nhóm amin của lớp L-Cysteine và các nhóm amin của anti-BSA, giúp kháng thể được cố định bền vững trên bề mặt điện cực. Điện cực sau đó được làm sạch, ký hiệu là SPAuE/SAM/anti-BSA và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để chuẩn bị cho việc phát hiện protein BSA ở các nồng độ khác nhau.

Bước 3 bắt giữ kháng nguyên, Bước 4 phân tích tín hiệu huỳnh quang, Bước 5 khảo sát đặc tính điện hoá hoàn toàn tương tự với 3 bước 3, 4, 5 đã trình bày ở mục 3.2.1. *Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC.*

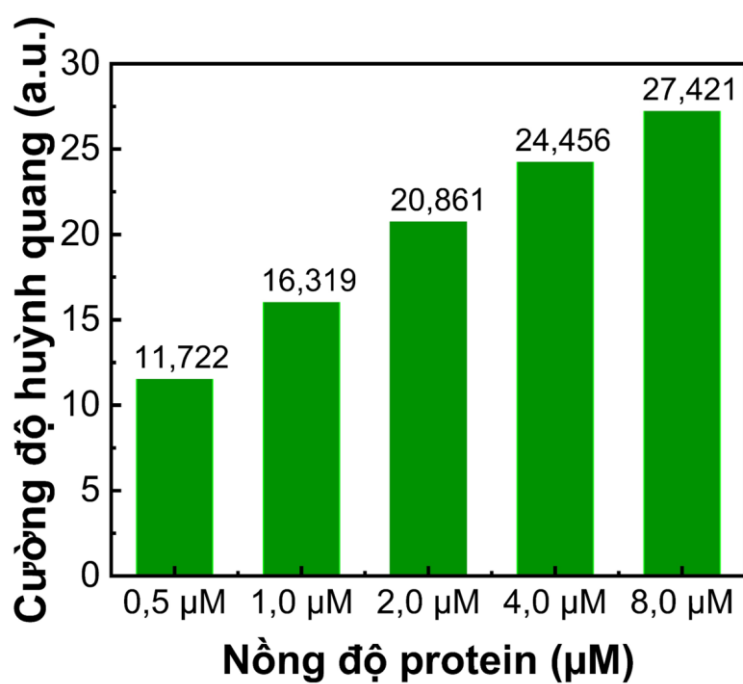
P1.1.3. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC

P1.1.3.1. Kết quả khảo sát tín hiệu quang

Hình P1.2 cung cấp hình ảnh bề mặt điện cực làm việc SPAuE/SAM/anti-BSA/BSA với nồng độ protein BSA-FITC từ 0,5 μM đến 8,0 μM . Các khung chữ nhật nét đứt biểu thị vùng ROI cố định để thực hiện định lượng cường độ huỳnh quang. Những hình ảnh quang này cho thấy khi nồng độ tăng lên thì cường độ huỳnh quang trở nên mạnh hơn. Hình P1.3 cho thấy cường độ huỳnh quang định lượng bằng phần mềm ImageJ, lần lượt là 11,722; 16,319; 20,861; 24,456 và 27,421 tương ứng với nồng độ 0,5 μM , 1,0 μM , 2,0 μM , 4,0 μM và 8,0 μM . Nồng độ càng lớn thì tín hiệu quang càng rõ. Kết quả này chứng tỏ sự thành công trong việc bắt giữ và phát hiện protein BSA-FITC ở các nồng độ khác nhau.



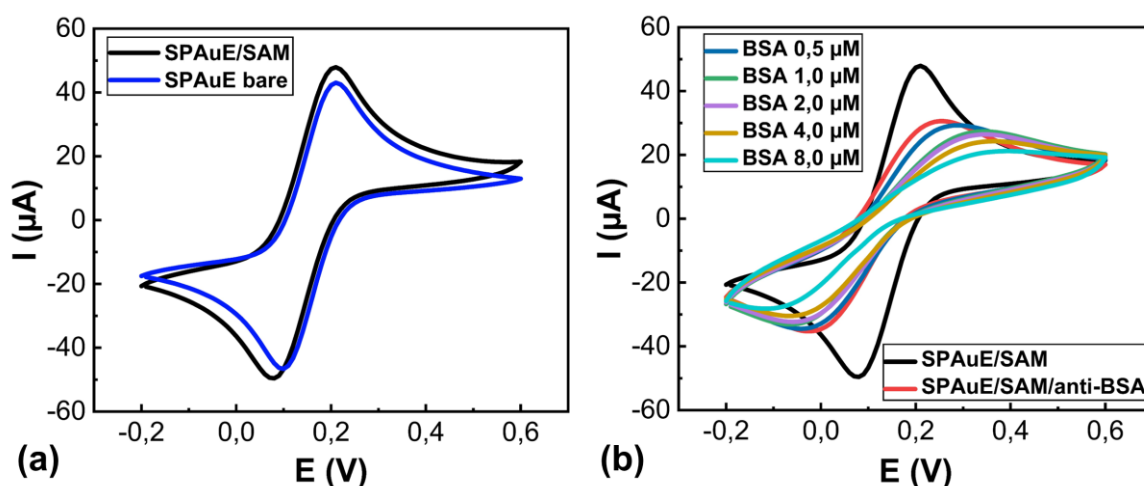
Hình P1.2. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC trên bề mặt điện cực làm việc SPAuE/SAM/anti-BSA/BSA ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM .



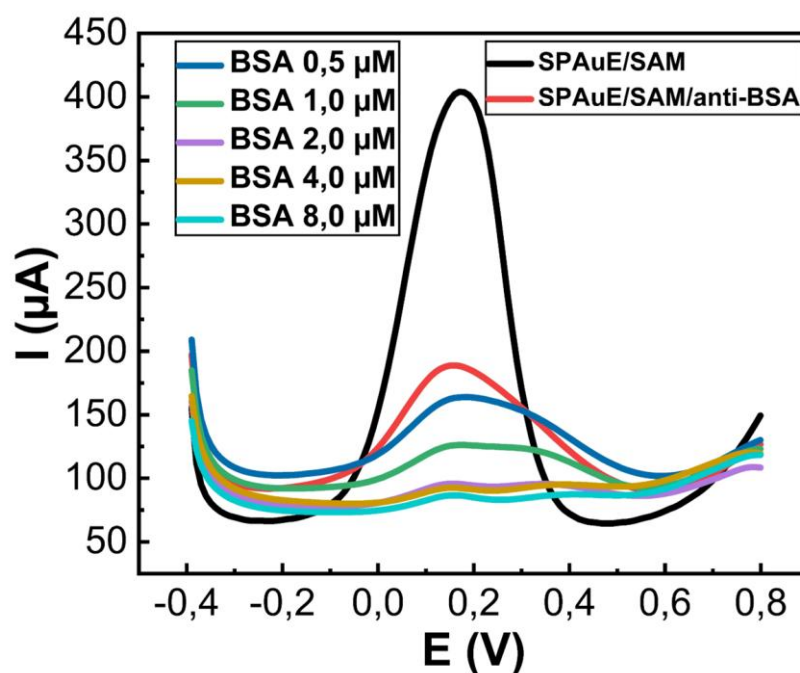
Hình P1.3. Cường độ huỳnh quang ở các nồng độ protein từ 0,5 μM đến 8,0 μM .

P1.1.3.2. Kết quả khảo sát tín hiệu điện

Ngoài tín hiệu quang, tín hiệu điện hóa được khảo sát để khẳng định sự hình thành đơn lớp trên bề mặt điện cực và tín hiệu phát hiện protein BSA-FITC.



Hình P1.4. (a) Tín hiệu CV trước và sau khi hình thành SAM L-Cysteine trên bề mặt điện cực; (b) Tín hiệu CV sau khi hình thành SAM, cố định kháng thể BSA (anti-BSA) và bắt giữ protein ở các nồng độ protein BSA-FITC khác nhau.



Hình P1.5. Tín hiệu SWV sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và bắt giữ protein ở các nồng độ protein BSA khác nhau.

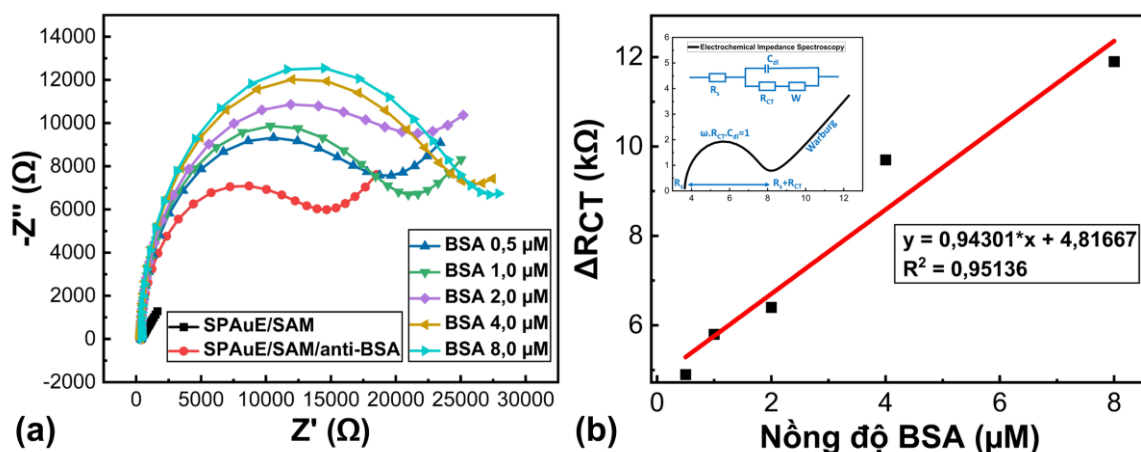
Hình P1.4a cho thấy tín hiệu CV trước và sau khi hình thành SAM L-Cysteine trên bề mặt điện cực. Sự gia tăng đỉnh dòng điện sau khi hình thành SAM cho thấy sự tăng tốc độ truyền điện tử [148], [149]. Dòng điện đỉnh được cải thiện sau khi hình thành SAM có thể được coi là một lợi thế của L-Cysteine so với các

SAM khác, thường được đặc trưng bởi trở kháng tăng [54], [142]. Hình P1.4b cho thấy tín hiệu CV của điện cực sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và phát hiện protein BSA-FITC ở các nồng độ khác nhau. Các đỉnh dòng điện giảm sau khi cố định đầu thu sinh học và bắt giữ protein mục tiêu ở các nồng độ khác nhau, nồng độ BSA-FITC càng cao thì tín hiệu dòng điện càng thấp. Để khẳng định xu hướng này, tín hiệu von-ampe sóng vuông (SWV) đã được khảo sát và minh họa trên Hình P1.5. Các đỉnh của dòng điện giảm mạnh sau khi cố định anti-BSA và bắt giữ protein ở các nồng độ protein BSA-FITC khác nhau từ 0,5 μM đến 8,0 μM .

Trong phương pháp EIS, giao tiếp giữa điện cực và chất điện ly được thể hiện bằng mạch tương đương Randles bao gồm R_s , C_{dl} , R_{CT} và W . R_{CT} đặc trưng cho sự truyền điện tích, nó phụ thuộc vào hình thái cũng như độ dẫn điện của bề mặt điện cực [150]. Do đó, để nghiên cứu sự thay đổi độ dẫn điện của bề mặt điện cực sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và ở các nồng độ khác nhau của protein BSA-FITC, các điện cực được khảo sát tín hiệu EIS, kết quả được thể hiện trên Hình P1.6. Hình P1.6a cho thấy đường kính hình bán nguyệt của biểu đồ Nyquist ngày càng tăng tương ứng với R_{CT} tăng sau khi cố định đầu thu sinh học (SPAuE/SAM/anti-BSA) và bắt giữ protein BSA-FITC ở các nồng độ khác nhau. Hình chèn trong Hình P1.6b hiển thị mạch tương đương Randles được tự động khớp với phần mềm PStace 5.9 để tính các giá trị R_{CT} . Hình P1.6b thể hiện sự tương quan tuyến tính với hệ số R^2 là 0,95136, biểu thị sự biến thiên của điện trở truyền điện tích (ΔR_{ct}) là hàm tương ứng với thay đổi về nồng độ BSA-FITC (C_M) từ 0,5 μM đến 8,0 μM như sau:

$$\Delta R_{CT}(\text{k}\Omega) = 0,94301 \times C_M(\mu\text{M}) + 4,81667 \quad (\text{P1.1})$$

Sự chênh lệch đáng kể ở cả tín hiệu dòng điện và trở kháng giữa điện cực sau khi gắn kháng thể và phủ SAM, cho thấy anti-BSA được cố định thành công trên bề mặt điện cực, đặt nền tảng cho việc phát hiện protein BSA.



Hình P1.6. (a) Tín hiệu EIS sau khi hình thành SAM, cố định anti-BSA và thu giữ protein ở các nồng độ protein BSA-FITC khác nhau; (b) ΔR_{ct} được vẽ dưới dạng hàm của nồng độ protein BSA-FITC.

P1.1.4. Kết luận

Trên cơ sở liên kết chéo sử dụng Glutaraldehyde, quy trình biến tính điện cực miễn dịch ba bước, nhanh và hiệu quả, dựa trên lớp SAM L-Cysteine đã được xây dựng thành công để phát hiện protein BSA-FITC. Cảm biến cho thấy sự tương quan rõ rệt giữa tín hiệu điện hóa (CV, SWV, EIS) và tín hiệu quang học theo nồng độ protein, trong đó tín hiệu ΔR_{ct} thể hiện mối quan hệ tuyến tính mạnh với nồng độ BSA-FITC ($R^2 = 0,95136$).

P1.2. Cố định kháng thể thông qua liên kết cộng hoá trị trên SAM L-Cysteine hoạt hoá bằng EDC/NHS

P1.2.1. Hoá chất và thiết bị

Hóa chất, điện cực và thiết bị sử dụng trong quy trình này tương tự như đã trình bày ở mục 3.2.1. *Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC.* Trong quy trình này, SAM L-Cysteine được sử dụng để tạo lớp nền hỗ trợ cố định kháng thể hiệu quả, thay thế cho SAM MUA nhằm đánh giá ảnh hưởng của thành phần SAM đến khả năng cố định sinh học và truyền điện tích. Hình 3.2 mô tả kết nối của thiết bị đo PalmSens4 với điện cực SPAuE và phần mềm PS Trace 5.9 trên máy tính.

P1.2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực

Quy trình chức năng hoá điện cực vàng sử dụng SAM L-Cysteine được thực hiện theo các bước tương tự như quy trình đã trình bày ở mục 3.2.1. *Quy trình chức năng hoá điện cực vàng phát hiện protein BSA-FITC*. Khác biệt chính của quy trình này nằm ở việc thay thế lớp SAM MUA bằng SAM L-Cysteine, cho phép đánh giá ảnh hưởng của loại hợp chất thiol lên khả năng cố định kháng thể và hiệu quả truyền điện tích của bề mặt điện cực.

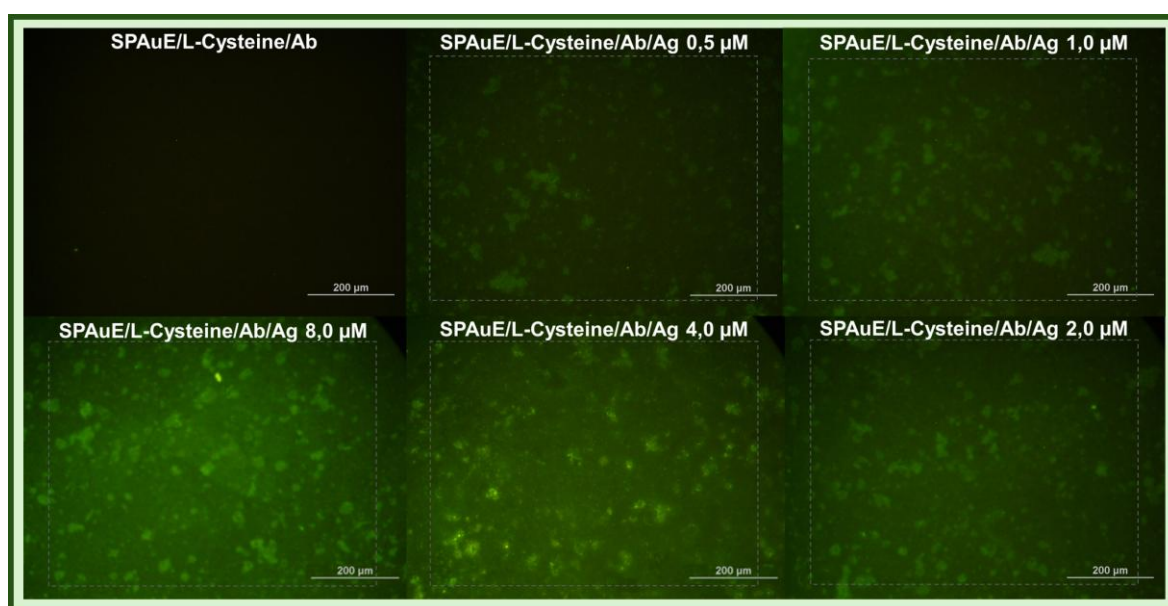
Cụ thể, điện cực vàng SPAuE được ngâm qua đêm ở nhiệt độ phòng trong dung dịch L-Cysteine 5 mM pha trong PBS 1X để hình thành lớp SAM L-Cysteine thông qua liên kết Au-S giữa nhóm thiol (–SH) của L-Cysteine và bề mặt vàng của điện cực. Sau khi hình thành lớp SAM, điện cực được rửa năm lần bằng nước DI và sấy nhẹ bằng khí nitơ nhằm loại bỏ các phân tử không gắn kết. Các bước tiếp theo bao gồm hoạt hoá lớp SAM bằng EDC/NHS, cố định kháng thể anti-BSA, và phát hiện protein BSA-FITC trong dải nồng độ 0,5–8,0 μM được tiến hành tương tự như mô tả ở mục 3.2.1.

Các phép đo CV, SWV và EIS, cùng với phân tích huỳnh quang và SEM/EDX, được sử dụng để xác nhận quá trình cố định sinh học và đánh giá hiệu quả truyền điện tích của lớp SAM L-Cysteine.

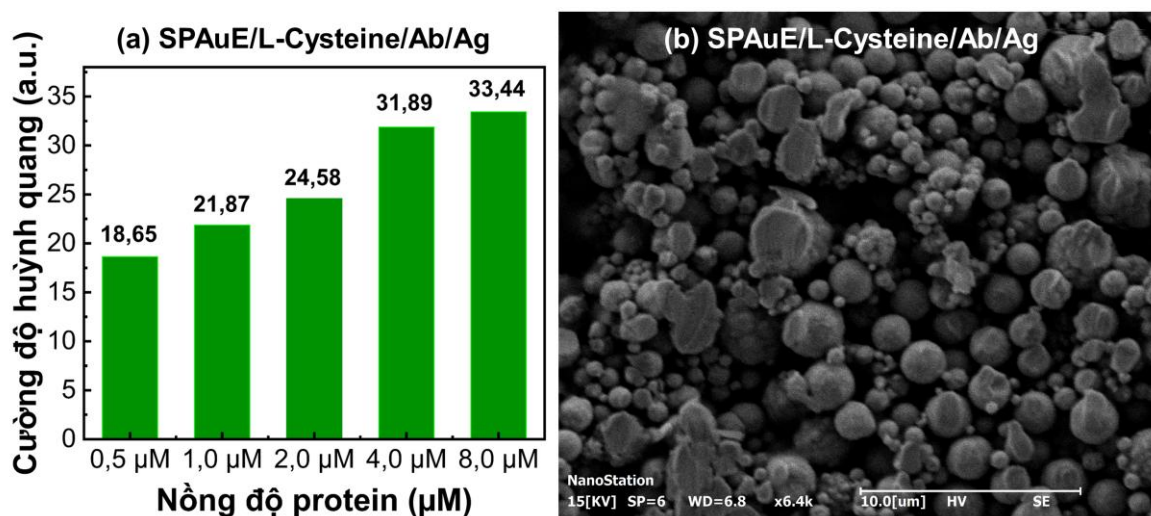
P1.2.3. Kết quả phát hiện protein BSA-FITC

P1.2.3.1. Kết quả khảo sát tín hiệu quang

Hình P1.7 trình bày ảnh hiển vi huỳnh quang của các điện cực được biến tính bằng lớp SAM L-Cysteine sau khi bắt giữ protein BSA-FITC ở các nồng độ khác nhau. Cường độ huỳnh quang tăng dần theo nồng độ BSA-FITC từ 0,5 đến 8,0 μM , cho thấy quá trình gắn kết protein diễn ra hiệu quả và các kháng thể được cố định ổn định trên bề mặt điện cực. Kết quả này chứng minh lớp SAM L-Cysteine cung cấp nền tảng thuận lợi cho sự tương tác đặc hiệu giữa kháng thể anti-BSA và kháng nguyên BSA-FITC, đồng thời khẳng định tính khả thi của quy trình chức năng hoá điện cực bằng hợp chất thiol này.



Hình P1.7. Ảnh huỳnh quang của protein BSA-FITC (Ag) ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM được bắt giữ trên bề mặt điện cực cố định kháng thể anti-BSA (Ab). Các khung chữ nhật nét đứt biểu thị vùng ROI cố định để thực hiện định lượng cường độ huỳnh quang.



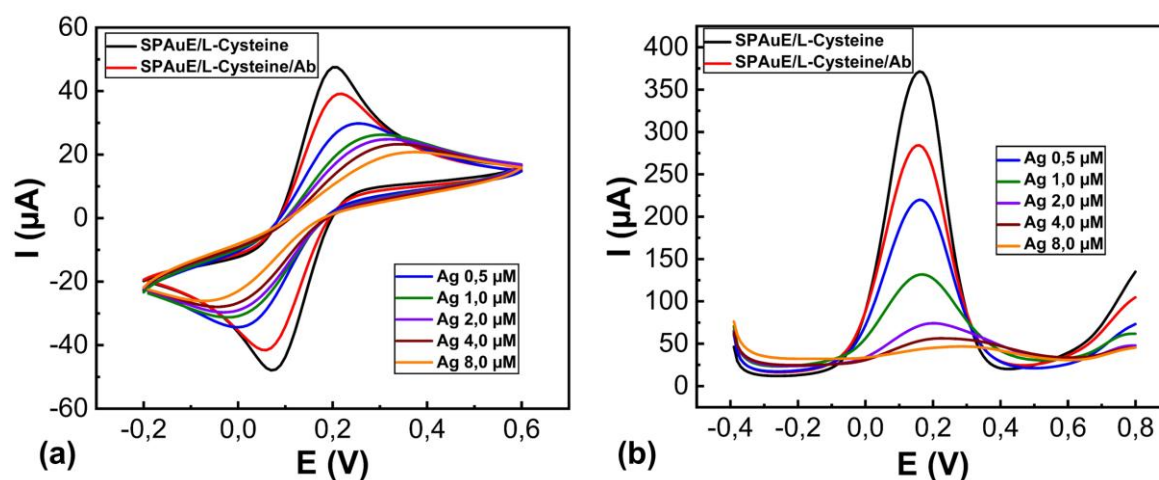
Hình P1.8. Đánh giá huỳnh quang và hình thái bề mặt của điện cực sau khi bắt giữ BSA-FITC: (a) Cường độ huỳnh quang của protein BSA-FITC ở các nồng độ từ 0,5 μM đến 8,0 μM ; (b) Ảnh SEM của điện cực sau khi bắt giữ protein BSA-FITC ở nồng độ 5,0 μM .

Các vùng ROI cố định được sử dụng để định lượng cường độ huỳnh quang trung bình bằng phần mềm ImageJ, đảm bảo tính nhất quán giữa các phép đo, cho thấy cường độ huỳnh quang tăng theo nồng độ protein BSA-FITC và, phù hợp với

xu hướng đã quan sát trên điện cực phủ SAM MUA. Hình P1.8a cho thấy cường độ huỳnh quang tăng từ 18,65 lên 33,44 khi nồng độ BSA-FITC tăng từ 0,5 μM đến 8,0 μM , phản ánh rõ rệt quá trình bắt giữ protein phụ thuộc nồng độ.

Những đặc điểm hình thái quan sát được trên ảnh SEM ở Hình P1.8b cho thấy sự xuất hiện của các vùng kết tụ không đồng nhất và độ gồ ghề tăng lên trên bề mặt điện cực sau khi gắn protein ở nồng độ 5,0 μM . Các đặc điểm này phù hợp với kết quả huỳnh quang, khẳng định hiệu quả của quá trình biến tính bề mặt và sự bắt giữ protein thành công trên các điện cực đã biến tính bằng L-Cysteine. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cho rằng chuỗi phân tử ngắn và đặc tính lưỡng cực của L-Cysteine giúp tăng cường tương tác sinh học [151], thúc đẩy sự hình thành lớp đơn ổn định [149], đồng thời giảm thiểu hiện tượng hấp phụ không đặc hiệu [149], [151], [152].

P1.2.3.2. Kết quả khảo sát tín hiệu điện

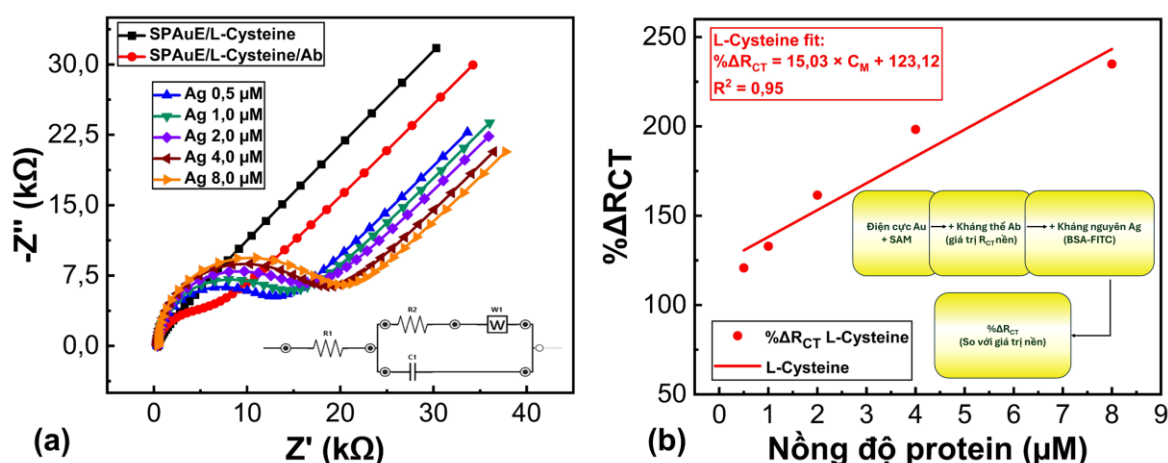


Hình P1.9. Đáp ứng điện hóa của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: (a) Tín hiệu CV; (b) Tín hiệu SWV của điện cực phủ L-Cysteine, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM).

Hình P1.9 mô tả các đáp ứng CV và SWV tương ứng của điện cực được biến tính bằng L-Cysteine trong cùng quy trình phát hiện BSA-FITC. Tương tự điện cực MUA, các phổ điện hóa cũng thể hiện sự dịch chuyển dương của thế oxy hóa và sự suy giảm dòng đỉnh theo nồng độ kháng nguyên, xác nhận quá trình gắn kết sinh

học diễn ra tuần tự. Tuy nhiên, điện cực L-Cysteine cho tín hiệu dòng cao hơn đáng kể so với điện cực MUA, phản ánh khả năng truyền điện tích tốt hơn tại giao diện điện cực – dung dịch điện ly. Cụ thể, dòng đỉnh SWV giảm từ 354,70 μA sau khi hình thành SAM xuống 263,30 μA sau khi cố định kháng thể, và còn 15,41 μA khi phát hiện BSA-FITC ở nồng độ 8,0 μM .

Sự thay đổi có hệ thống này khẳng định độ tin cậy của tín hiệu điện hóa, đồng thời cho thấy rằng L-Cysteine, với cấu trúc phân tử ngắn và nhóm chức lưỡng cực, vừa duy trì khả năng truyền điện tích cao vừa đảm bảo tính đặc hiệu trong quá trình phát hiện kháng nguyên.



Hình P1.10. (a) Phổ EIS của quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein: điện cực phủ SAM, điện cực cố định kháng thể và điện cực phát hiện BSA-FITC (0,5–8,0 μM); (b) Đồ thị hiệu chuẩn biểu diễn mối quan hệ tuyến tính của $\% \Delta R_{CT}$ vào nồng độ BSA-FITC (Hình chèn: sơ đồ minh họa phép đo $\% \Delta R_{CT}$ so với giá trị nền sau khi gắn kháng thể).

Hình P1.10a trình bày phổ EIS của điện cực SPAuE được biến tính bằng L-Cysteine, sau khi cố định kháng thể và phát hiện BSA-FITC trong dải nồng độ 0,5–8,0 μM . Tương tự MUA, đường kính bán nguyệt trên đồ thị Nyquist tăng dần khi nồng độ BSA-FITC tăng, biểu hiện sự gia tăng R_{CT} do quá trình gắn kết kháng nguyên–kháng thể. Tuy nhiên, các giá trị R_{CT} của điện cực L-Cysteine thấp hơn rõ rệt so với MUA, cho thấy khả năng truyền điện tích vượt trội. Giá trị R_{CT} được tự động fitting bằng phần mềm PS Trace 5.9, với chất lượng fitting được đánh giá qua

tham số Chi-squared (χ^2). Đối với điện cực biến tính L-Cysteine, giá trị χ^2 dao động từ 0,0031 đến 0,0086 trong toàn bộ dải nồng độ, cho thấy mô hình mạch tương đương phù hợp tốt với dữ liệu thực nghiệm.

Mối quan hệ giữa $\% \Delta R_{CT}$ và nồng độ C_M của BSA-FITC được thể hiện trong Hình P1.10b, cho thấy mối tương quan tuyến tính trong toàn dải khảo sát, được mô tả bởi phương trình hồi quy:

$$\% \Delta R_{CT} = 15,03 \times C_M + 123,12 \quad (R^2 = 0,95) \quad (P1.2)$$

Độ dốc của đường hồi quy đạt 15,03 $\% \Delta R_{CT}/\mu M$, với giới hạn phát hiện (LOD) 0,03 μM . Những kết quả này chứng minh rằng điện cực biến tính bằng L-Cysteine duy trì trở kháng thấp, truyền điện tích nhanh, và có tiềm năng cao trong phát triển cảm biến miễn dịch điện hóa có độ nhạy cao.

P1.2.4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu với lớp SAM L-Cysteine hoạt hoá bằng EDC/NHS đã chứng minh tính hiệu quả của quy trình chức năng hoá bề mặt điện cực vàng trong việc cố định kháng thể và phát hiện protein BSA-FITC. Ảnh huỳnh quang cho thấy tín hiệu tăng theo nồng độ BSA-FITC, khẳng định sự gắn kết kháng nguyên đặc hiệu và tính ổn định của lớp SAM. Ảnh SEM thể hiện rõ sự thay đổi hình thái bề mặt sau khi bắt giữ protein, với độ gồ ghề tăng nhẹ và xuất hiện các vùng kết tụ, phản ánh quá trình biến tính bề mặt diễn ra thành công.

Các phép đo điện hóa (CV, SWV và EIS) đều thể hiện sự biến thiên tín hiệu nhất quán với cơ chế gắn kết sinh học, cho phép đánh giá định lượng hiệu quả quá trình phát hiện protein. Điện cực biến tính bằng L-Cysteine duy trì giá trị dòng đỉnh cao, điện trở truyền điện tích thấp và độ nhạy cao (15,03 $\% \Delta R_{CT}/\mu M$), với giới hạn phát hiện đạt 0,03 μM .

Những kết quả này cho thấy rằng SAM L-Cysteine là một nền tảng biến tính bề mặt hiệu quả, vừa hỗ trợ quá trình cố định kháng thể thông qua liên kết cộng hoá trị, vừa đảm bảo khả năng phát hiện kháng nguyên trong dải nồng độ khác nhau.

Quy trình này có thể được xem là một mô hình đáng tin cậy, phù hợp để áp dụng trong các nghiên cứu phát triển cảm biến sinh học điện hoá dựa trên cơ chế nhận biết đặc hiệu kháng nguyên–kháng thể.

2. PHỤ LỤC 2 - ỨNG DỤNG MỞ RỘNG CỦA QUY TRÌNH CHỨC NĂNG HOÁ ĐIỆN CỰC TRONG PHÁT HIỆN PROTEIN NSE

Để chứng minh tính đa mục tiêu và khả năng mở rộng của quy trình chức năng hoá điện cực đã được phát triển, luận án triển khai thêm một nghiên cứu ứng dụng với đối tượng khác, đó là protein NSE (Neuron-Specific Enolase). NSE là protein chỉ dấu sinh học quan trọng trong chẩn đoán sớm ung thư phổi tế bào nhỏ SCLC (Small-Cell Lung Carcinoma) [153]. Nghiên cứu ở phụ lục này cho thấy rằng cùng một quy trình biến tính bề mặt điện cực cacbon bằng hạt nano vàng (AuNPs), tạo đơn lớp tự lắp ráp SAM từ 11-MUA hoạt hoá bằng EDC/NHS và cố định kháng thể đặc hiệu, có thể được tái sử dụng và điều chỉnh linh hoạt để phát hiện nhiều loại protein khác nhau ngoài mục tiêu chính của luận án.

Việc áp dụng cùng công nghệ lõi của hệ thống để phát hiện NSE đã khẳng định tính khả chuyển, ổn định và hiệu quả của quy trình chức năng hoá, mở ra khả năng phát triển nền tảng cảm biến điện hoá đa mục tiêu có thể tích hợp vào các thiết bị xét nghiệm sinh học di động hoặc hệ thống chẩn đoán tại chỗ POCT (Point-of-Care Testing).

P2.1. Hoá chất và thiết bị

Cặp hoá chất chính gồm protein Human NSE tái tổ hợp (Neuron-Specific Enolase) và kháng thể đơn dòng kháng NSE của hãng ThermoFisher Scientific (Mỹ). Các hoá chất còn lại, điện cực, thiết bị tương tự với danh mục hoá chất, điện cực và thiết bị đã cung cấp ở quy trình chức năng hoá điện cực cacbon phát hiện protein VP28, mục 3.2.2.1.

P2.2. Quy trình chức năng hoá điện cực

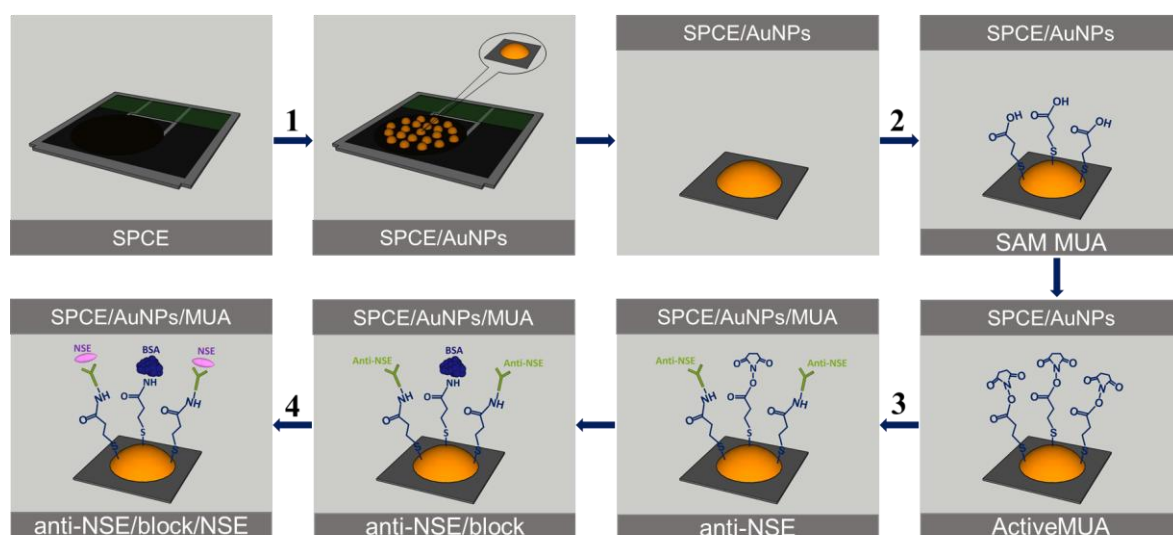
Quy trình phát hiện protein NSE bao gồm các bước: phủ hạt nano vàng (AuNPs), hình thành và hoạt hoá lớp tự lắp ráp SAM từ MUA, cố định kháng thể đặc hiệu anti-NSE, và phát hiện kháng nguyên NSE ở các nồng độ khác nhau được thể hiện trên Hình P2.1.

Các bước phủ hạt nano vàng, hình thành và hoạt hoá lớp SAM, kết nối điện cực với hệ thống đo và thiết lập phép đo điện hoá được thực hiện hoàn toàn tương tự các bước (1), (2), (5) trong quy trình biến tính phủ hạt nano vàng và chức năng hoá điện cực phát hiện protein VP28, đã được trình bày tại Mục 3.2.2.2.

Riêng hai bước (3) và (4) trong quy trình này được thay thế bằng hóa chất và tác nhân sinh học đặc trưng cho hệ NSE, cụ thể:

- Kháng thể đơn dòng anti-NSE được pha ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$.

- Protein NSE tái tổ hợp được pha loãng trong dung dịch PBS 1X với các nồng độ khác nhau trong dải 10 ng/mL đến 500 ng/mL để tiến hành thí nghiệm phát hiện và định lượng.

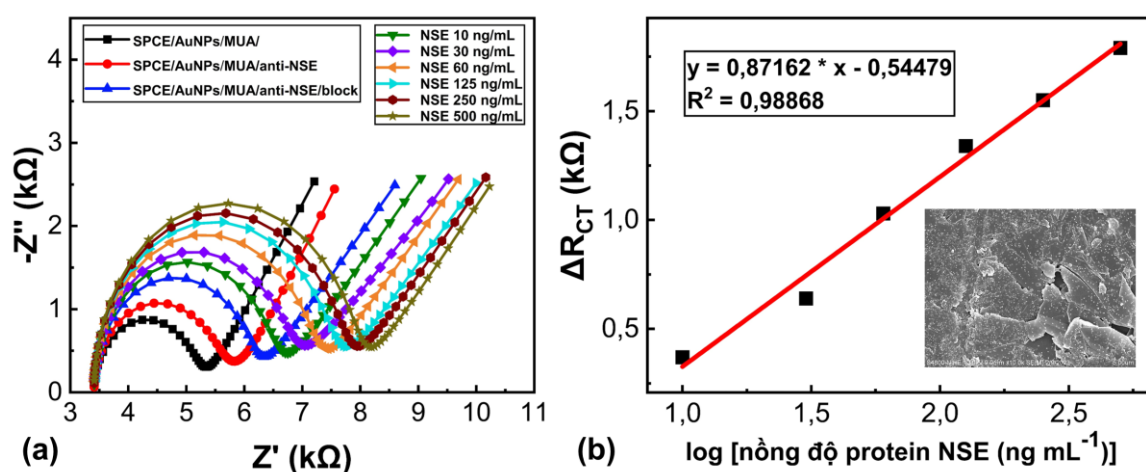


Hình P2.1. Quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện protein NSE.

P2.3. Kết quả phát hiện protein NSE

Hình P2.2 trình bày kết quả đo trở kháng điện hoá (EIS) được biểu diễn dưới dạng đồ thị Nyquist của các điện cực đã được biến tính theo từng bước của quy trình đã trình bày ở mục P2.2. Đồ thị Nyquist cung cấp cái nhìn trực quan về sự thay đổi trở kháng của điện cực làm việc sau mỗi bước biến tính từng lớp vật liệu trên bề mặt điện cực.

Sự có mặt của lớp hạt nano vàng (AuNPs) trên bề mặt điện cực cacbon làm giảm đáng kể điện trở truyền điện tích như đã đề cập ở phần trước. Việc cố định các phân tử MUA để hình thành lớp tự lắp ráp SAM trên bề mặt điện cực khiến giá trị điện trở tăng từ 0,4 k Ω lên 1,6 k Ω tại giao diện điện cực – dung dịch, do độ dẫn điện thấp đặc trưng của lớp SAM. Sau khi hoạt hoá nhóm chức carboxyl trên SAM, các bước biến tính tiếp theo: cố định kháng thể anti-NSE, chặn các vị trí hoạt động không đặc hiệu bằng BSA, tiếp tục làm tăng điện trở R_{CT} của điện cực lên tương ứng 2,0 k Ω và 2,7 k Ω (Hình P2.2a)



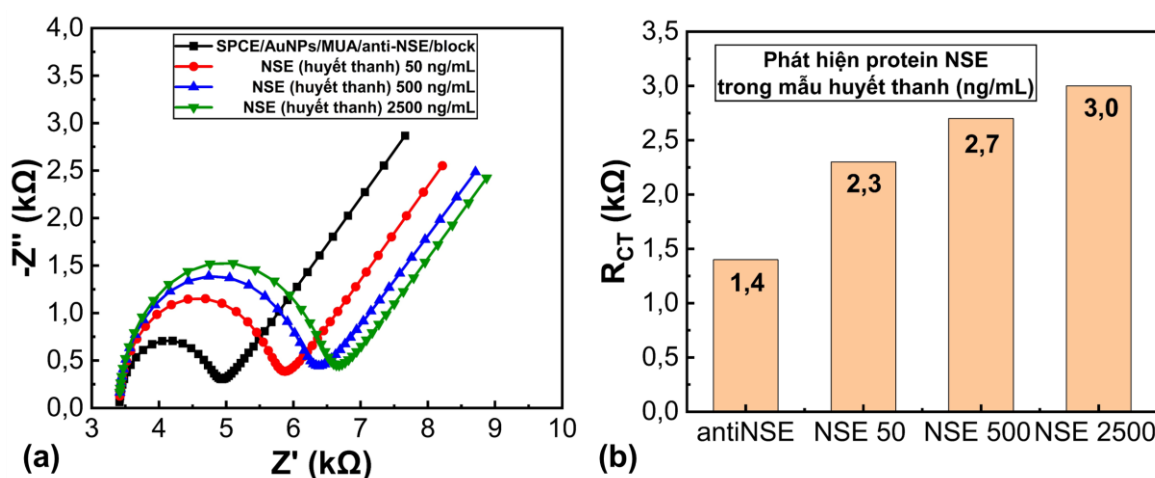
Hình P2.2. Phát hiện protein NSE: (a) Đáp ứng phổ trở kháng quy trình chức năng hoá điện cực phát hiện NSE trong dải nồng độ 10 ng/mL đến 500 ng/mL; (b) Đường đặc tính sử dụng ΔR_{CT} là hàm của nồng độ protein NSE (Hình chèn: bề mặt điện cực làm việc được phủ các hạt nano vàng).

Giá trị R_{CT} tiếp tục tăng khi kháng nguyên NSE được gắn kết vào điện cực thông qua cấu trúc SAM và kháng thể đã được chức năng hoá. Hình P2.2a cho thấy giá trị R_{CT} tăng dần theo các nồng độ protein NSE khác nhau là 3,1 k Ω ; 3,3 k Ω ; 3,7 k Ω ; 4,0 k Ω ; 4,2 k Ω ; và 4,5 k Ω , tương ứng với các nồng độ 10 ng/mL, 30 ng/mL, 60 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, và 500 ng/mL. Sự tăng trở này liên quan đến việc hình thành phức hợp miễn dịch kháng nguyên–kháng thể ổn định; đồng thời, lớp protein có tính kỵ nước làm cản trở dẫn điện trên bề mặt điện cực. Ngoài ra, sự cản trở trao đổi electron này là bằng chứng rõ ràng cho thấy quá trình cố định kháng nguyên NSE trên điện cực đã diễn ra thành công theo quy trình được đề xuất.

Hình P2.2b mô tả đường hiệu chuẩn tuyến tính được thiết lập trong khoảng nồng độ 10 ng/mL đến 500 ng/mL của protein NSE, theo phương trình sau:

$$y = 0,87162 \times x - 0,54479 \quad (\text{P2.1})$$

trong đó y là giá trị thay đổi điện trở truyền điện tích ΔR_{CT} (k Ω) và x là logarit nồng độ protein NSE (ng/mL). Hệ số tương quan thu được có giá trị $R^2 = 0,98868$, cho thấy mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa tín hiệu đo và logarit nồng độ mẫu. Giới hạn phát hiện $LOD = 3,19$ ng/mL.



Hình P2.3. (a) Đáp ứng phổ trở kháng; (b) Giá trị R_{CT} của điện cực chức năng hoá phát hiện protein NSE được pha loãng trong các mẫu huyết thanh.

Protein NSE có thể được sử dụng như một chỉ dấu hỗ trợ trong chẩn đoán khối u thông qua phép đo định lượng trong mẫu huyết thanh. Ba mẫu NSE có nồng độ 50 ng/mL, 500 ng/mL, và 2500 ng/mL được pha loãng trong huyết thanh. Điện cực chức năng hóa ban đầu có giá trị $R_{CT} = 1,4$ k Ω . Hình P2.3 cho thấy sự thay đổi của phổ EIS theo các nồng độ NSE khác nhau trong mẫu huyết thanh. Giá trị R_{CT} tăng lần lượt lên 2,3 k Ω , 2,7 k Ω , và 3,0 k Ω , tương ứng với các nồng độ được khảo sát, cho thấy cảm biến phản ứng ổn định và nhạy trong môi trường sinh học phức tạp.

P2.4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu về phát hiện protein NSE đã khẳng định rõ tính khả chuyển và đa mục tiêu của quy trình chức năng hoá điện cực được phát triển trong

lược án. Quy trình bao gồm các bước phủ hạt nano vàng (AuNPs), hình thành lớp tự lắp ráp SAM MUA, hoạt hoá bằng EDC/NHS, và cố định kháng thể đặc hiệu đã được áp dụng thành công để phát hiện NSE chỉ dấu sinh học quan trọng trong chẩn đoán sớm ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC).

Các kết quả điện hoá thu được cho thấy cảm biến có độ nhạy cao, giới hạn phát hiện thấp và khả năng phản hồi ổn định trong cả mẫu chuẩn và mẫu huyết thanh, chứng minh tính hiệu quả và độ tin cậy của phương pháp. Việc triển khai quy trình này cho đối tượng sinh học khác ngoài VP28 cho thấy công nghệ lõi có thể tái sử dụng, mở rộng và điều chỉnh linh hoạt, tạo nền tảng cho phát triển hệ thống cảm biến điện hoá đa mục tiêu, hướng tới thiết bị xét nghiệm sinh học di động và chẩn đoán tại chỗ trong tương lai.

3. PHỤ LỤC 3 - MÃ NGUỒN

Toàn bộ mã nguồn của chương trình lập trình và hướng dẫn cài đặt, sử dụng phần mềm được cập nhật tại link:

<https://github.com/htthuylinh/ecma>

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG

ĐỀ TÀI:

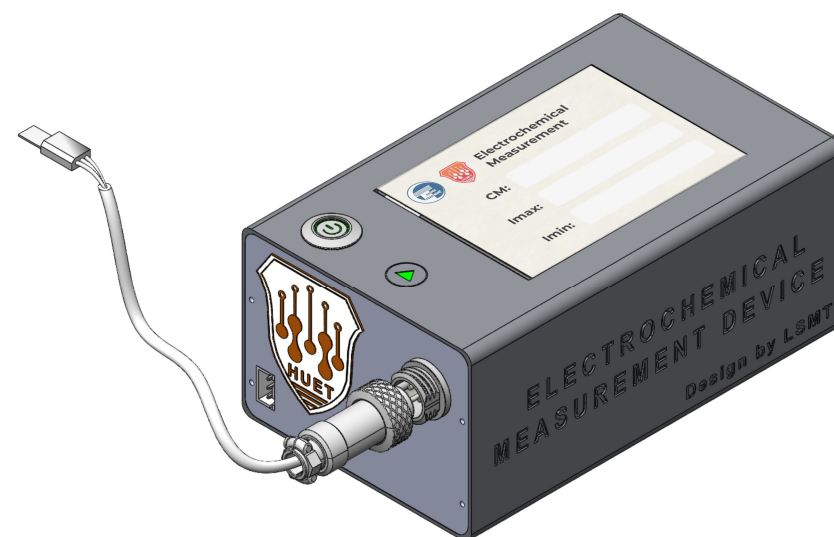
NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN
TẠI CHỖ BỆNH TÔM ĐỐM TRẮNG DỖ VI-RÚT TRÊN
TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

NGHIÊN CỨU SINH: HUỲNH THỊ THÙY LINH

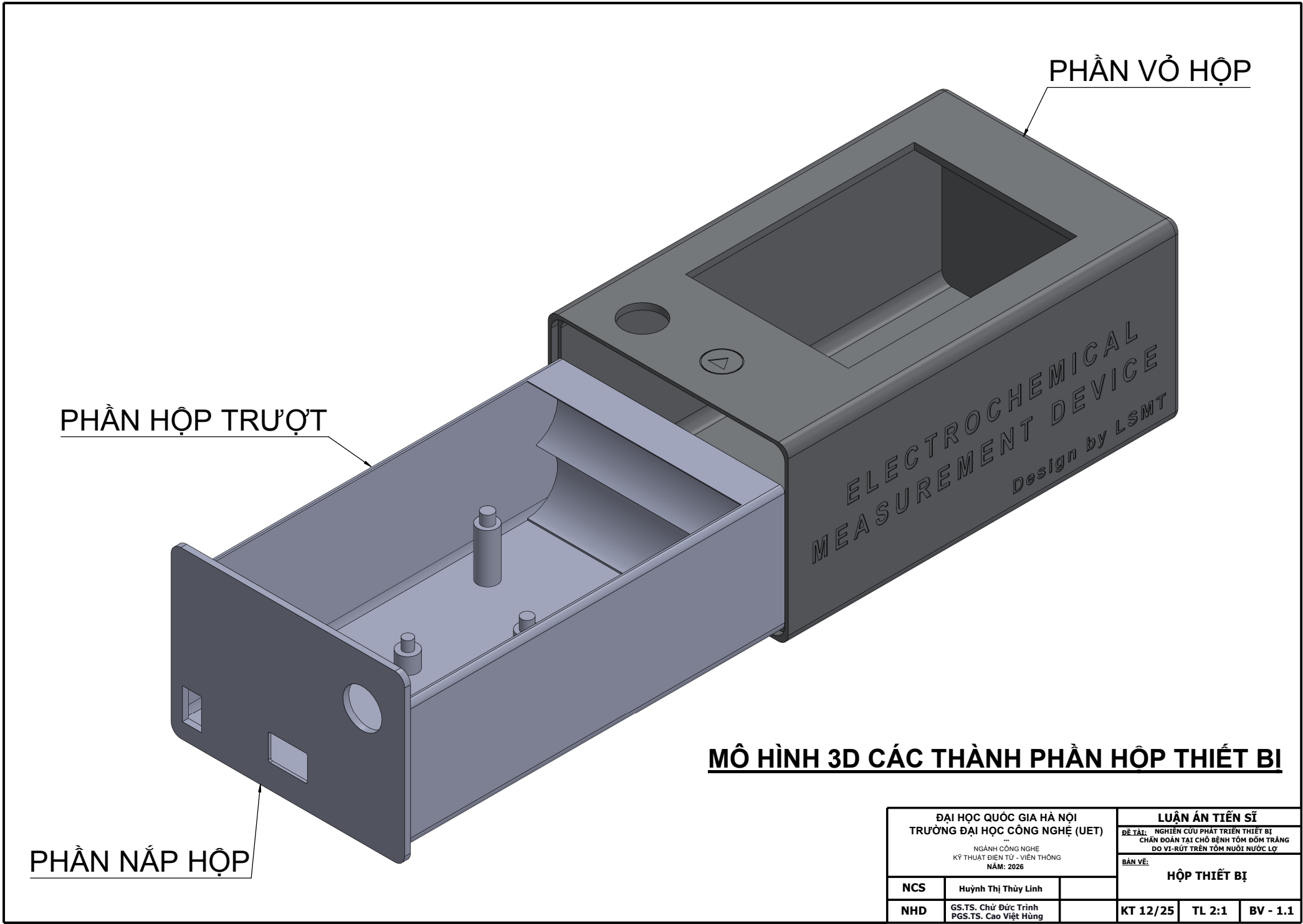
NGƯỜI HƯỚNG DẪN: GS.TS. CHỦ ĐỨC TRÌNH
PGS.TS. CAO VIỆT HÙNG

CHUYÊN NGÀNH: KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ

MÃ SỐ: 9520203

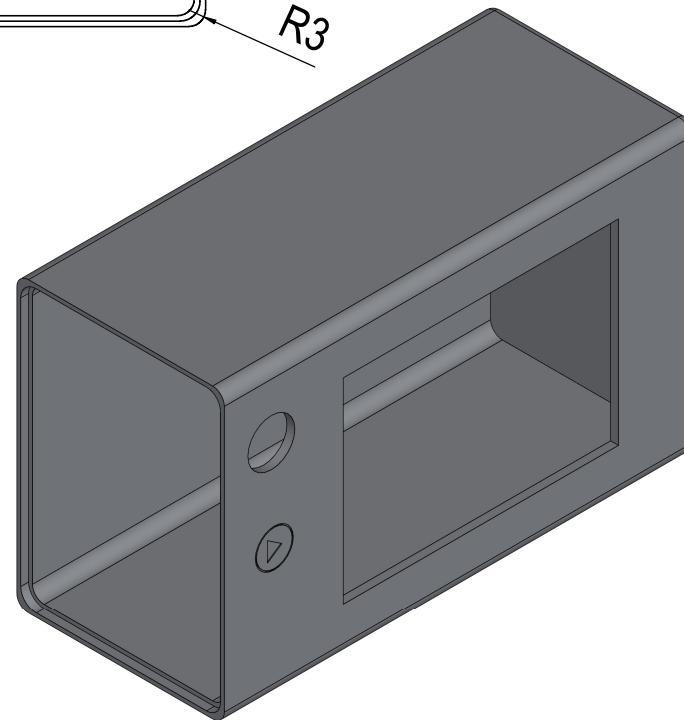
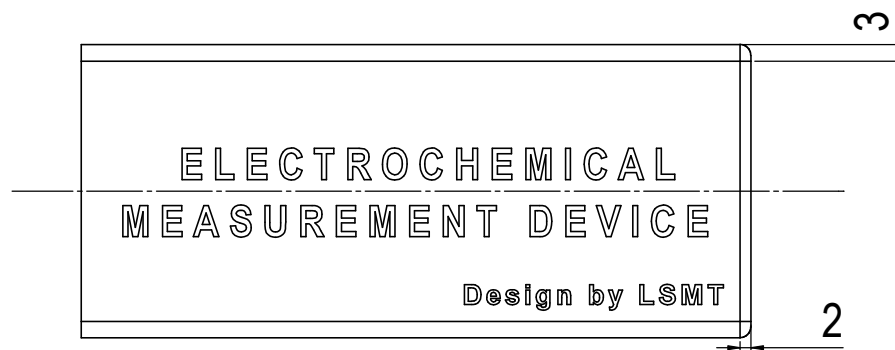
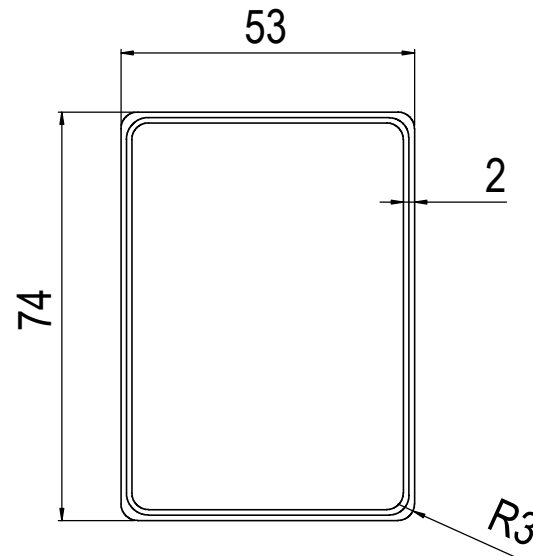
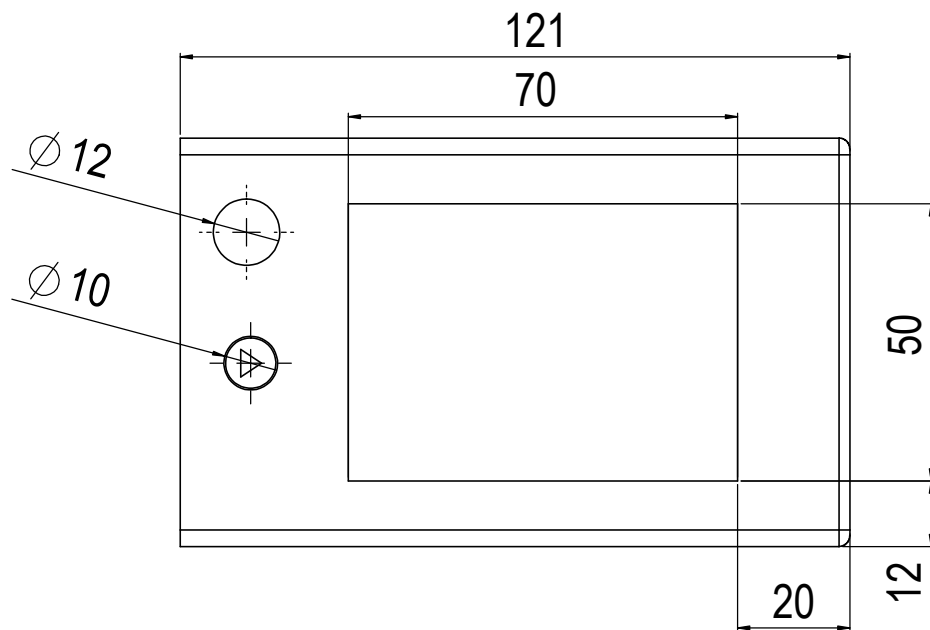


HÀ NỘI - 2026



MÔ HÌNH 3D CÁC THÀNH PHẦN HỘP THIẾT BỊ

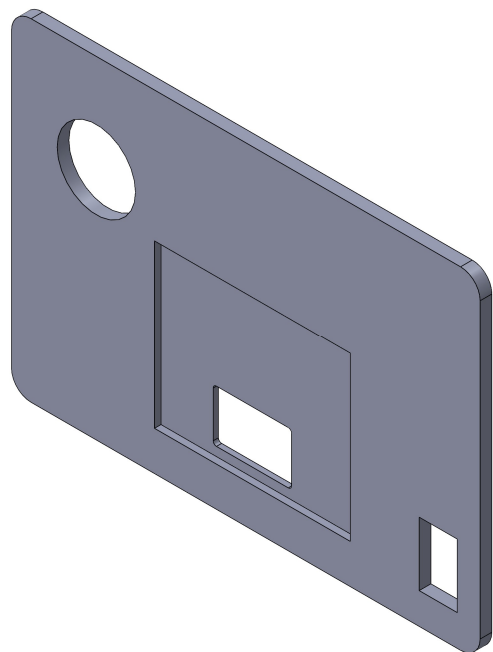
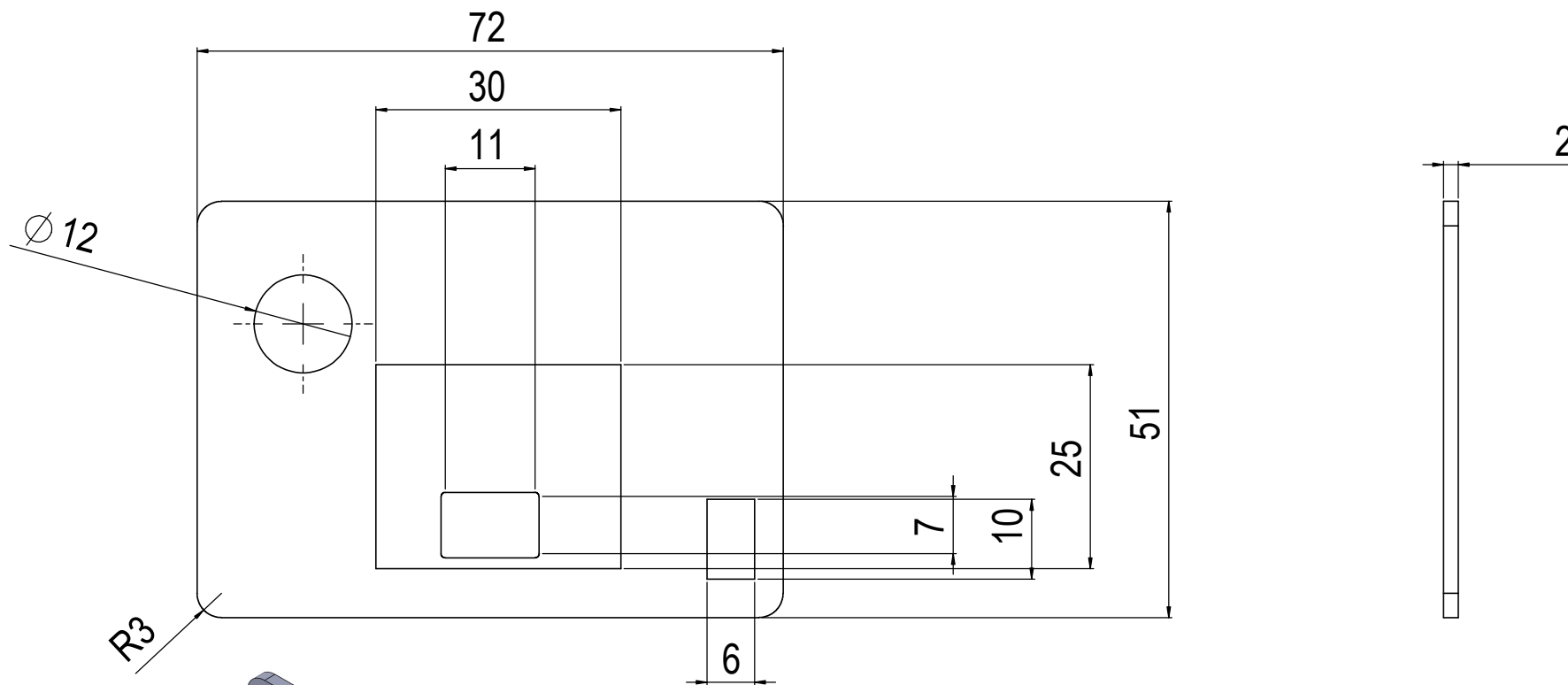
ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ (UET)			LUẬN ÁN TIẾN SĨ		
NGÀNH CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG NĂM: 2026			ĐỀ TÀI: NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN TẠI CHỖ BỆNH TỖM ĐỎM TRẮNG DO VI-RÚT TRÊN TỖM NUÔI NƯỚC LỢ		
			BẢN VẼ: HỘP THIẾT BỊ		
NCS	Huỳnh Thị Thùy Linh				
NHD	GS.TS. Chử Đức Trình PGS.TS. Cao Việt Hùng		KT 12/25	TL 2:1	BV - 1.1



BA HÌNH CHIẾU VÀ MÔ HÌNH 3D PHẦN VỎ HỘP

- + Sử dụng nhựa in 3D PLA+
- + Mài nhẵn sơn phủ nền
- + Sơn màu bạc bề mặt

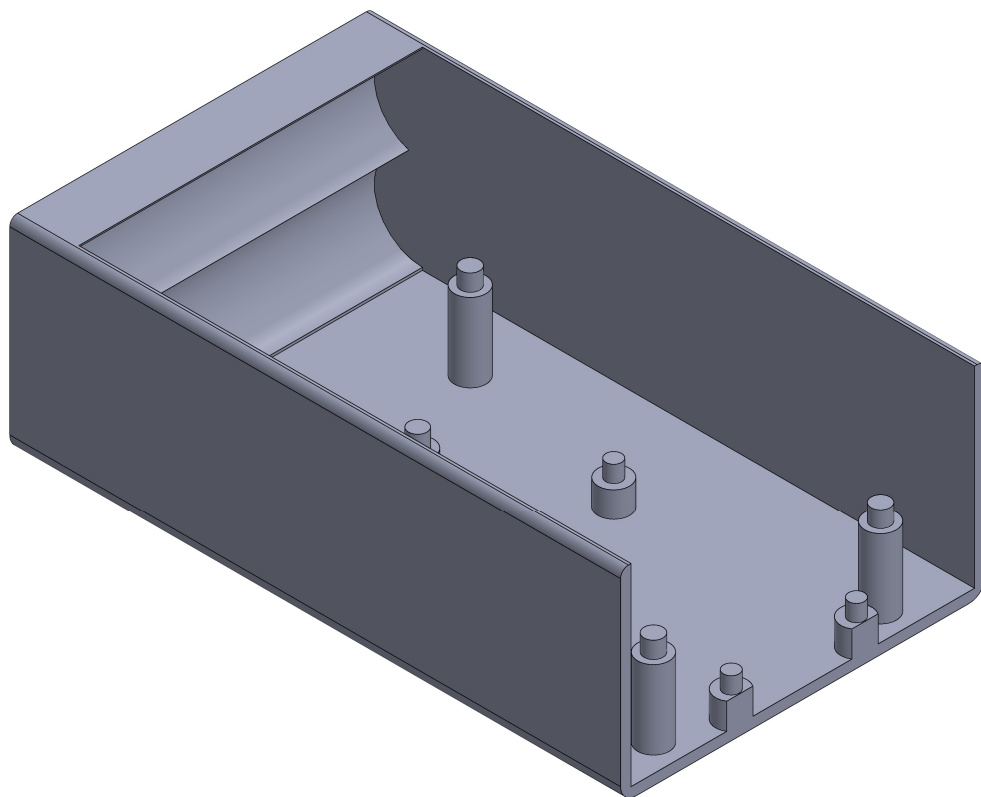
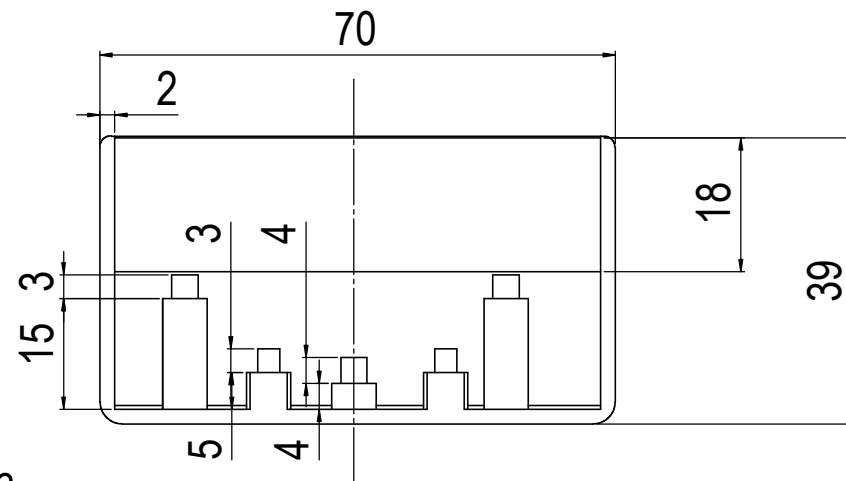
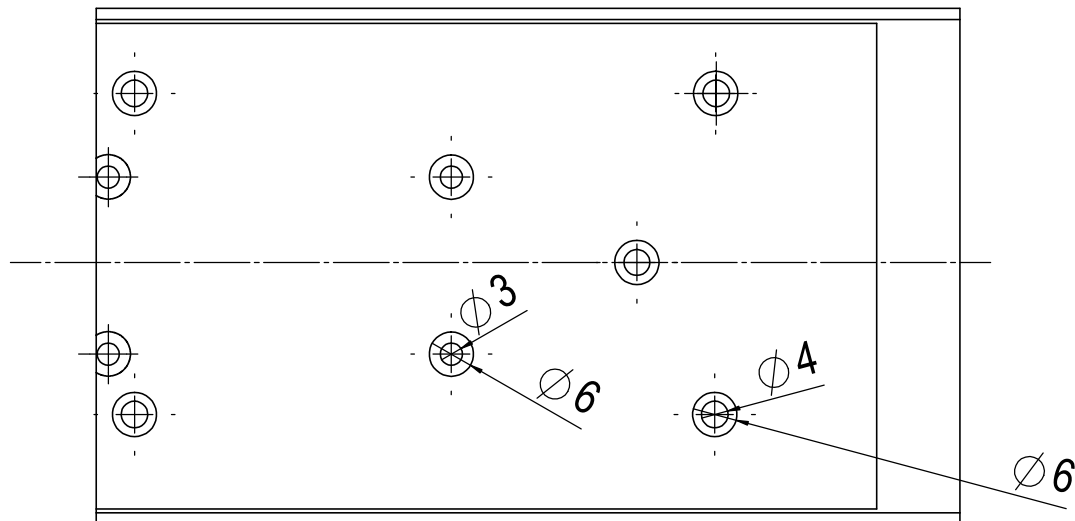
ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ (UET)			LUẬN ÁN TIẾN SĨ		
NGÀNH CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG NĂM: 2026			ĐỀ TÀI: NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN TẠI CHỖ BỆNH TỖM ĐỘM TRẮNG DO VI-RÚT TRÊN TỖM NUÔI NƯỚC LỢ		
BẢN VẼ:			VỎ HỘP		
NCS	Huỳnh Thị Thủy Linh				
NHD	GS.TS. Chử Đức Trình PGS.TS. Cao Việt Hùng		KT 12/25	TL 1.5:1	BV - 1.2



HÌNH CHIẾU VÀ MÔ HÌNH 3D PHẦN NẮP HỘP

- + Sử dụng nhựa in 3D PLA+
- + Mài nhẵn sơn phủ nền
- + Sơn màu bạc bề mặt

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ (UET)			LUẬN ÁN TIẾN SĨ		
NGÀNH CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG NĂM: 2026			ĐỀ TÀI: NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN TẠI CHỖ BỆNH TÔM ĐỐM TRẮNG DO VI-RÚT TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ		
			BẢN VẼ:		
			NẮP HỘP		
NCS	Huỳnh Thị Thủy Linh				
NHD	GS.TS. Chữ Đức Trình PGS.TS. Cao Việt Hùng		KT 12/25	TL 2.5:1	BV - 1.3



HÌNH CHIẾU VÀ MÔ HÌNH 3D PHẦN TRƯỢT

- + Sử dụng nhựa in 3D PLA+
- + Mài nhẵn sơn phủ nền

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ (UET)			LUẬN ÁN TIẾN SĨ		
NGÀNH CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT ĐIỆN TỬ - VIỄN THÔNG NĂM: 2026			ĐỀ TÀI: NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CHẨN ĐOÁN TẠI CHỖ BỆNH TÂM ĐỘM TRẮNG DO VI-RÚT TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ		
NCS			HỌ TÊN: Huỳnh Thị Thùy Linh		
NHD			GS.TS. Chử Đức Trình PGS.TS. Cao Việt Hùng		
			HỘ TRƯỞNG		
			KT 12/25	TL 2:1	BV - 1.4

