

NGHIÊN CỨU GẮN ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG THỂ
LÊN HẠT NANO VÀNG SẢN XUẤT QUE THỬ SẮC KÝ MIỄN DỊCH
PHÁT HIỆN NHANH AFLATOXIN M1

Nguyễn Đức Điển^{1*}, Nguyễn Văn Chuyên¹, Nguyễn Minh Phương¹
Nguyễn Văn Ba¹, Nguyễn Thị Thu Trang¹, Lê Tuấn Anh¹, Hoàng Thị Trường¹
Vũ Thị Hoa¹, Nguyễn Trọng Đạt², Nguyễn Hoàng Trung¹

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định một số thông số kỹ thuật của que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Aflatoxin M1 (AFM1). **Phương pháp nghiên cứu:** Que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh AFM1. Các thông số tối ưu bao gồm: Nồng độ kháng thể nhận diện bao phủ lên hạt nano vàng, dung dịch đệm nhỏ lên que thử, tính ổn định của kháng thể trên màng cộng hợp. **Kết quả:** Nồng độ kháng thể tối ưu là 5 µg/mL; dung dịch đệm nhỏ lên que thử để tăng gắn kết đặc hiệu là MES (50mM, pH 6,7). Độ ổn định của kháng thể trên màng cộng hợp là 3 tháng. Sử dụng 5 que thử trên cùng 1 lô sản xuất để thử nghiệm độ lặp lại, quan sát thấy 5/5 mẫu có độ lặp lại. **Kết luận:** Bằng cách gắn định hướng kháng thể lên hạt nano vàng, tối ưu hóa dung dịch xử lý màng cộng hợp, tối ưu dung dịch nhỏ mẫu, đã phát triển được que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh AFM1.

Từ khóa: Que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh; LFIA; Gắn định hướng kháng thể; Aflatoxin M₁; Độ nhạy.

RESEARCH ON ORIENTED IMMOBILIZATION OF ANTIBODY
ON GOLD NANOPARTICLES TO PRODUCE LATERAL FLOW
IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF AFLATOXIN M1

Abstract

Objectives: To determine some technical parameters of lateral flow immunoassay for rapid detection of Aflatoxin M1. **Methods:** Competitive lateral flow immunoassay

¹Học viện Quân y

²Viện Y học dự phòng Quân đội

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Điển (drdiennd@gmail.com)

Ngày nhận bài: 25/9/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 10/01/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i3.529>

for rapid detection of Aflatoxin M1. Optimal parameters include the concentration of recognition antibody covering the gold nanoparticle, buffer solution applied to the test strip, and stability of the antibody on the conjugate membrane. **Results:** The optimal antibody concentration was 5 µg/mL; the buffer solution dropped onto the test strip to increase specific binding was MES (50mM, pH 6.7). The stability of the antibody on the conjugate membrane was 3 months. 5 test strips from the same production batch were used to test repeatability, and 5/5 samples were observed to have repeatability. **Conclusion:** By orienting the antibody onto the gold nanoparticle, optimizing the conjugate membrane treatment solution, and optimizing the running buffer, we have developed lateral flow immunoassay to quickly detect Aflatoxin M1.

Keywords: Lateral flow immunoassay; LFIA; Oriented immobilization; Aflatoxin M1; Sensitivity.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Aflatoxin M1 là chất chuyển hóa của Aflatoxin B1. Nếu bò ăn thức ăn nhiễm Aflatoxin B1, độc tố này sẽ được hấp thu nhanh chóng và chuyển hóa thành AFM1 và bài tiết qua sữa. Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế đã phân loại AFM1 là tác nhân gây ung thư nhóm 1 [1]. Tỷ lệ nhiễm AFM1 trong sữa trên thế giới đã được báo cáo rộng rãi.

Một số phương pháp phân tích để xác định AFM1 bao gồm: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC), xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme (enzyme-linked immunosorbent - ELISA). Trong số các phương pháp xét nghiệm nhanh để sàng lọc mức độ nhiễm của chất cần phân tích, xét nghiệm sắc ký miễn dịch dòng chảy bên (lateral flow immunoassay - LFIA) gần đây đã được

sử dụng nhiều để phân tích độc tố nấm mốc. Ưu điểm của LFIA là thực hiện nhanh chóng, đơn giản đặc biệt là trong phân tích ngoài thực địa.

Do tính ưu việt của phương pháp LFIA trong việc xác định AFM1 trong sữa nên hiện nay đã có một số nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện theo phương pháp này. Tác giả Chun Wang đã sử dụng hạt nano vàng làm chỉ thị màu; định dạng này có giới hạn phát hiện là 50 µg/mL và thời gian xét nghiệm là 30 phút [2]. Tại Việt Nam, có 1 công trình nghiên cứu bộ kit phát hiện nhanh AFM1 trong sữa tươi của Viện Thú y, tác giả trên sử dụng gắn kháng thể lên hạt nano vàng theo phương pháp hấp thụ vật lý. Hạn chế của phương pháp hấp thụ vật lý là sử dụng nồng độ kháng thể đơn dòng cao, khó bắt cặp kháng nguyên vì vị trí bắt cặp kháng nguyên Fab nằm vô hướng.

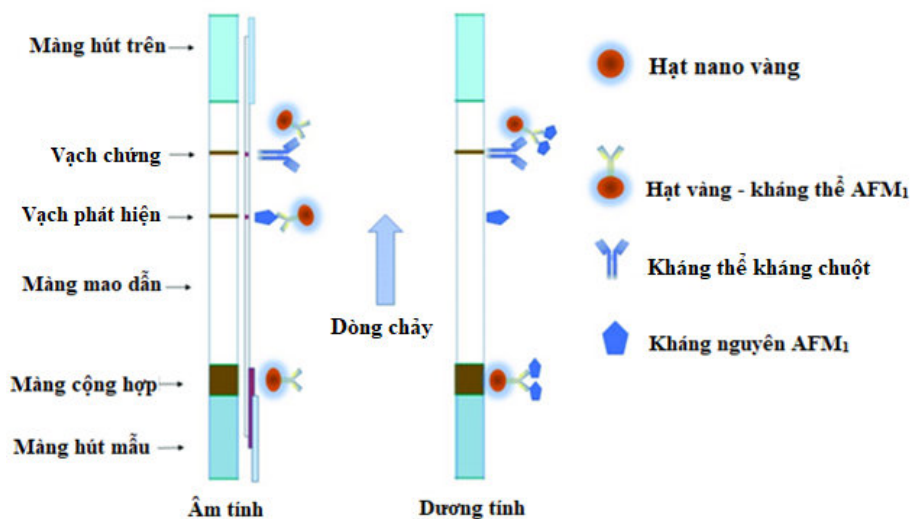
Do vậy, để loại bỏ các hạn chế trên chúng tôi gắn định hướng kháng thể lên hạt nano vàng để phát hiện nhanh AFM1 trong sữa. Nghiên cứu của chúng tôi là phương pháp mới và là công trình đầu tiên gắn định hướng kháng thể lên hạt nano vàng để phát hiện AFM1 trong sữa, với mục tiêu: *Xác định một số thông số kỹ thuật để sản xuất que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh AFM1.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất thiết bị nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu:* Que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh AFM1.

Sơ đồ của LFIA cạnh tranh được thể hiện trong hình 1. Cơ chế LFIA dựa trên sự cạnh tranh của kháng nguyên AFM1 có trong mẫu thử nghiệm với kháng nguyên được trải trên màng nitrocellulose. Với sự có mặt của kháng nguyên AFM1, phức hợp hạt vàng-kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên có trong mẫu và không thể phản ứng với kháng nguyên trải trên màng mao dẫn. Nếu không xuất hiện vạch phát hiện thì đây là mẫu dương tính. Trong trường hợp không có kháng nguyên AFM1, phức hợp hạt vàng-kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên ở vùng thử nghiệm. Sự xuất hiện của vạch phát hiện trong thời gian 15 phút, đánh giá đây là phản ứng âm tính [3].



Hình 1. Sơ đồ minh họa que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh AFM1.

* *Vật liệu nghiên cứu:* Độc tố AFM1.

* *Hóa chất:* Kháng thể đơn dòng kháng AFM1 (A0925-01B; Biotrend; USA); và kháng nguyên AFM1 (NB-42-00267; Biotrend; USA). Kháng thể IgG kháng chuột (M5899; Sigma; Germany), Bovine Serum Albumin (BSA); đệm Borat; Tris buffered saline (TBS); Phosphate buffered saline (PBS); Tween 20; đường sucrose, lactose; 11-mercaptopundecanoic (11 MUA); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS) được mua từ Sigma; Germany. Hạt nano vàng 20nm (ab269935) được mua từ abcam.

* *Vật tư tiêu hao:* Màng nitrocellulose (FF120HP whatman; USA); màng cộng hợp (Standard 17 whatman; USA); màng hút mẫu và màng hút trên (CF4 whatman; USA); tấm lót plastic vinyl (Whatman). Tất cả các loại màng được mua từ Whatman.

* *Thiết bị nghiên cứu:* Cân kỹ thuật; cân phân tích CPA 324S; máy Vortex Delta Mixer; máy Spin Down C1301B-230V; máy rung, lắc ELISA; máy ly tâm; tủ ẩm; lò nung; bể rung siêu âm; máy khuấy cơ, máy khuấy từ; micropipet các loại; máy đo pH; hệ thống in phun que thử CAMAG-AUTOKUN; máy hút ẩm; máy đo nanodrop; lò lai phân tử; hệ thống đọc khay vi thể; tủ lạnh sâu -20°C; tủ lạnh Heracus 4°C; máy ly tâm Solval...

* *Phạm vi nghiên cứu:* Chế tạo que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh AFM1 quy mô phòng thí nghiệm.

* *Thời gian và địa điểm nghiên cứu:* Thời gian tiến hành nghiên cứu từ tháng 01/2021 - 6/2023. Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Vệ sinh Quân đội, Học viện Quân y và thuộc đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu đặc điểm nhiễm độc tố vi nấm trong một số thực phẩm tại Việt Nam và chế tạo que thử bán định lượng phát hiện nhanh, đồng thời một số độc tố vi nấm”. Mã số: ĐTDL.CN-04/21.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm và kết quả xét nghiệm chỉ phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu của đề tài.

* *Nội dung nghiên cứu:*

- Tối ưu hóa gắn định hướng kháng thể lên hạt nano vàng:

Gắn kháng thể lên hạt nano vàng có thể dựa vào hấp thụ vật lý và phản ứng hóa học. Mặc dù phương pháp vật lý là đơn giản nhưng có một số hạn chế sau: Sử dụng nồng độ kháng thể đơn dòng cao, kháng thể gắn ngẫu nhiên lên bề mặt hạt nano vàng nên khó bắt cặp kháng nguyên. Do đó, chúng tôi lựa chọn phương pháp gắn định hướng kháng thể nhằm mục đích tăng độ nhạy của LFIA để phát hiện kháng nguyên AFM1. Các thông số quan trọng là:

Biến đổi bề mặt hóa học của hạt vàng, tạo ra nhóm chức để gắn cộng hóa trị; tối ưu hóa nồng độ kháng thể đơn dòng bao phủ lên hạt nano vàng.

+ Biến đổi bề mặt hóa học của hạt vàng: Biến đổi bề mặt hóa học của hạt nano vàng là tạo ra nhóm chức cacboxyl để gắn cộng hóa trị. 11 MUA thường được sử dụng vì có nhóm chức (-SH) và (-COOH) hoạt động ở 2 đầu. Gốc thiol (-SH) có ái lực mạnh với bề mặt vàng nên liên kết với bề mặt vàng, trong khi nhóm còn lại (-COOH) cung cấp gốc hóa học để hấp thụ kháng thể.

+ Hoạt hóa nhóm chức cacboxyl của AuNP-MUA bằng EDC và NHS: Sau khi biến đổi bề mặt hóa học, EDC và NHS sẽ hoạt hóa nhóm chức (-COOH) ở bề mặt hạt vàng, và hình thành este. Nhóm amin bậc một trong kháng thể sẽ phản ứng với este, và liên kết cộng hóa trị được hình thành.

+ Tối ưu hóa nồng độ kháng thể nhận diện: Gắn kháng thể lên hạt nano vàng đóng vai trò quan trọng trong tăng độ nhạy của que thử. Để đạt được mục tiêu này cần khảo sát nồng độ kháng thể nhận diện trên hạt nano vàng.

Cường độ tín hiệu màu sắc trên vạch kiểm tra của que thử tỷ lệ thuận với nồng độ kháng thể bao phủ trên bề mặt hạt nano vàng. Đối với LFIA sandwich, phù hợp với nồng độ cao của kháng thể bao phủ lên hạt vàng vì

dễ dàng để nhận biết kháng nguyên trong mẫu. Tuy nhiên LFIA cạnh tranh, mật độ kháng thể tăng lên trên bề mặt hạt vàng sẽ phản ứng với nồng độ cao của kháng nguyên trong mẫu và ngăn cản phản ứng của kháng thể và kháng nguyên trên vạch kiểm tra. Điều này có nghĩa là LOD cao hơn dự kiến. Do đó, chúng tôi cần tối ưu nồng độ kháng thể nhận diện bao phủ lên hạt nano vàng để tạo ra cường độ tín hiệu màu cao ở vạch kiểm tra khi thử nghiệm mẫu âm tính đồng thời phát hiện được LOD ở nồng độ thấp.

Lượng kháng thể đơn dòng AFM1 được khảo sát là: 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$. Sau khi ủ kháng thể ở 30°C trong thời gian 3 giờ, hạt nano vàng được ly tâm để loại bỏ kháng thể dư. Hạt vàng gắn kháng thể sau đó được blocking bằng BSA 2% trong 1 giờ.

Nồng độ mẫu chuẩn AFM1 được chuẩn bị là 0 $\mu\text{g/L}$; 0,25 $\mu\text{g/L}$; 0,5 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 2 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/L}$. Mỗi nồng độ được phân tích 5 lần trên que thử để xác định LOD. Giới hạn phát hiện của que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh được hiểu là nồng độ thấp nhất của kháng nguyên mà vạch thử nghiệm hoàn toàn không nhìn thấy. Mỗi thông số chúng tôi làm lại 5 lần để kiểm tra độ lặp lại của thử nghiệm. Thêm vào đó, chúng tôi xác định nồng độ chất

phân tích tối thiểu tạo ra tín hiệu màu sắc trên vạch thử nghiệm yếu hơn đáng kể so với mẫu âm tính.

Sau khi gắn định hướng kháng thể, chúng tôi trải kháng thể trên màng cộng hợp và đánh giá mẫu đạt bằng cách sử dụng mẫu âm tính và xác định LOD. Đánh giá mẫu đạt: Lượng kháng thể tối ưu trên hạt nano vàng chính là mẫu có cường độ tín hiệu màu sắc trên vạch kiểm tra là đậm khi thử nghiệm mẫu âm tính và nồng độ kháng nguyên thấp nhất mà vạch thử nghiệm mất màu.

- Tối ưu hóa tính ổn định của kháng thể trên màng cộng hợp:

Dung dịch đệm xử lý màng cộng hợp là yếu tố quan trọng đối với LFIA vì cường độ ion trong dung dịch đệm ảnh hưởng đến cấu trúc và khả năng phản ứng của kháng thể. Thêm vào đó nồng độ đường giữ được sự ổn định của kháng thể. Dung dịch đệm xử lý màng cộng hợp được chuẩn bị như sau: Borat pH 7,2; 1% (v/v) Tween 20; BSA 1%. Nồng độ đường được thử nghiệm là: 1% Lactose và 1% Sucrose, 5% Lactose và 5% Sucrose, và 10% Lactose và 10% Sucrose. Mỗi thông số chúng tôi tiến hành trên 5 lần với mẫu có chứa kháng nguyên AFM1 nồng độ 5 µg/L để kiểm tra âm tính giả và độ lặp lại, 5 lần với mẫu không có kháng nguyên để kiểm tra dương tính giả.

Độ ổn định của que thử được xác định bằng cách bảo quản que thử ở 25°C trong khoảng thời gian khác nhau. Sau đó quan sát sự thay đổi màu sắc vào ở thời gian 30 ngày, 60 ngày, 90 ngày [4]. Chức năng của kháng thể được đánh giá sau thời gian bảo quản, bằng cách kiểm tra cường độ tín hiệu màu sắc trên vạch kiểm tra khi thử nghiệm trên mẫu âm tính và trong cùng một nồng độ 0,25 µg/kg của mẫu dương tính. Mỗi thông số chúng tôi làm lại 5 lần để kiểm tra độ lặp lại của thử nghiệm.

- Tối ưu hóa dung dịch đệm nhỏ lên que thử:

Bộ đệm pha loãng kháng nguyên là thành phần quan trọng để làm tăng gắn kết đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Một số loại dung dịch đệm, nồng độ muối, chất hoạt động bề mặt, protein thường được tối ưu ở trong dung dịch đệm nhỏ mẫu. pH của dung dịch đệm có tác động đáng kể đến gắn kháng nguyên-kháng thể và thông thường pH phù hợp nằm trong khoảng 6,5 - 8,4. Chúng tôi lựa chọn dung dịch đệm Tris (70mM, pH 6,6); Tris (70mM, pH 6,8); Tris (70mM, pH 7,0); MES (50mM, pH 6,5); MES (50mM, pH 6,7); MES (50mM, pH 6,9) để thử nghiệm. Thêm vào đó, BSA 0,5% (w/v) được sử dụng như 1 chất chặn để giảm gắn kết không đặc hiệu giữa kháng thể và

màng. 0,5 % (v/v) Tween 20 là chất hoạt động bề mặt để loại bỏ gunk không đặc hiệu do tương tác kỵ nước.

Lựa chọn dung dịch đệm tối ưu: Dung dịch nhỏ vào que thử có cường

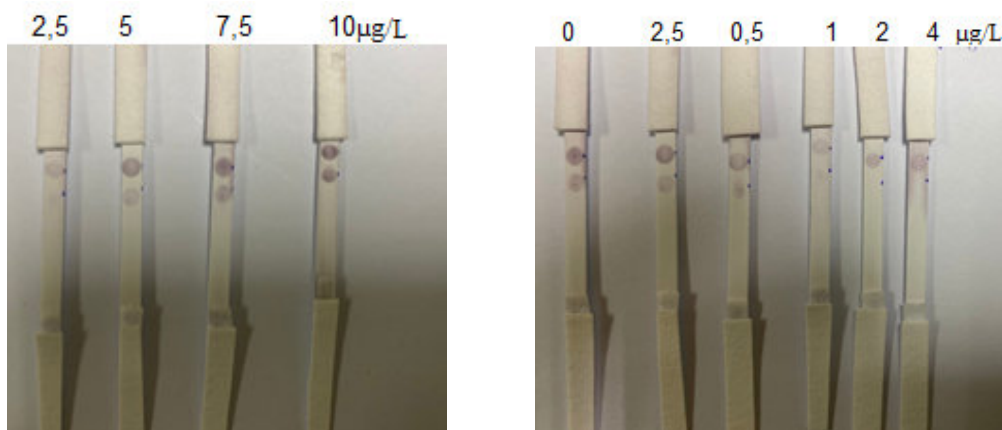
độ màu trên vạch kiểm tra là đậm nhất trong cùng một nồng độ 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ của mẫu dương tính. Mỗi thông số chúng tôi làm lại 5 lần để kiểm tra độ lặp lại của thử nghiệm.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tối ưu hóa gắn kháng thể lên hạt nano vàng theo phương pháp cộng hóa trị

Tổng cộng có 4 nồng độ kháng thể gắn lên hạt vàng đã được trải lên màng cộng hợp và dựng thành que thử để đánh giá nồng độ kháng thể tối ưu gắn lên hạt vàng.

* *Tối ưu hóa nồng độ kháng thể nhận diện:*



(a) Cường độ màu ở vùng thử nghiệm phụ thuộc vào nồng độ kháng thể gắn trên hạt vàng.

(b) Que thử với vạch đối chứng ở trên và vạch thử nghiệm ở dưới. Nồng độ mẫu chuẩn AFM1 là 0 $\mu\text{g}/\text{L}$; 0,25 $\mu\text{g}/\text{L}$; 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2 $\mu\text{g}/\text{L}$; 4 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Hình 2. Hình ảnh que thử về nồng độ của hạt vàng-kháng thể: 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Kết quả thử nghiệm trên que thử cho thấy khi tăng nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng thì tạo ra cường độ màu trên vạch thử nghiệm và vạch đối chứng là đậm hơn. Nồng độ kháng thể nhỏ nhất mà nhìn rõ vạch phát hiện và vạch đối chứng là 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng là 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt nano vàng là 5 µg/mL để kiểm tra giới hạn phát hiện của que thử. Nồng độ kháng nguyên AFM1 được phân tích trong hình 2b. Kết quả nghiên cứu cho thấy cường độ vạch thử nghiệm giảm khi nồng độ kháng nguyên tăng. Ở nồng độ mẫu chuẩn của AFM1 là 0,25 µg/L tạo ra sự khác biệt rõ rệt về cường độ màu của vạch thử nghiệm giữa mẫu dương tính và mẫu trắng. Ở nồng độ kháng nguyên 2 µg/L là nồng độ thấp nhất mà vạch thử nghiệm hoàn toàn không nhìn thấy. Vậy giới hạn phát hiện của que thử trong nghiên cứu của chúng tôi là 2 µg/L.

2. Tối ưu hóa chất ổn định hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp

Bảng 1. Kết quả ổn định hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp.

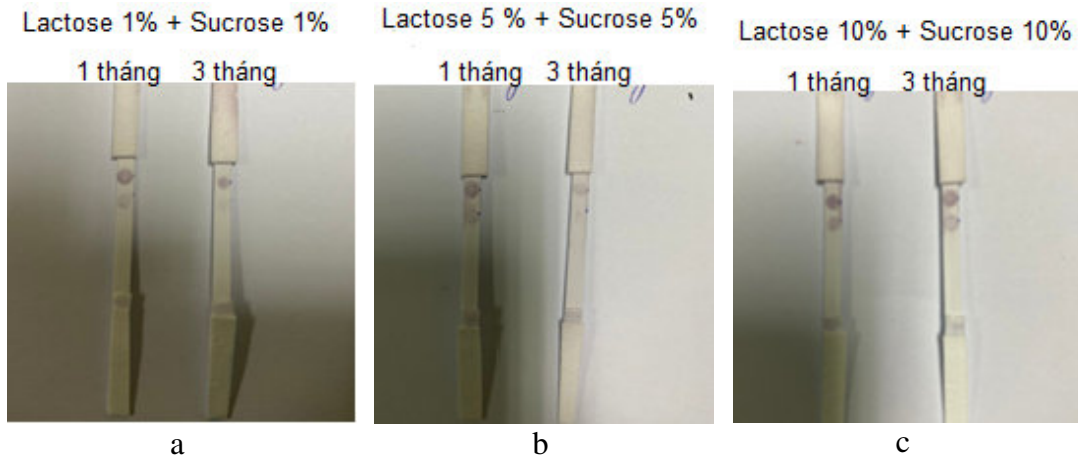
Thời gian (ngày)	1% (v/v) Tween 20; BSA 1%; 1% Lactose và 1% Sucrose; (n = 5)				1% (v/v) Tween 20; BSA 1%; 5% Lactose và 5% Sucrose; (n = 5)				1% (v/v) Tween 20; BSA 1%; 10% Lactose và 10% Sucrose; (n = 5)			
	Âm tính giả (%)	Dương tính giả (%)	Số mẫu đạt	Cường độ màu trên vạch phát hiện	Âm tính giả (%)	Dương tính giả (%)	Số mẫu đạt	Cường độ màu trên vạch phát hiện	Âm tính giả (%)	Dương tính giả (%)	Số mẫu đạt	Cường độ màu trên vạch phát hiện
30	0/5	0/5	10/10	++	0/5	0/5	10/10	++	0/5	0/5	10/10	++
60	0/5	0/5	10/10	+	0/5	0/5	10/10	++	0/5	0/5	10/10	++
90	0/5	0/5	10/10	+	0/5	0/5	10/10	+	0/5	0/5	10/10	++

(“++”: Cường độ màu đồ đậm. “+”: Cường độ màu nhạt. “-”: Không màu)

Đánh giá độ ổn định của kháng thể trên màng cộng hợp được thể hiện ở bảng 1. Nồng độ kháng thể đơn dòng AFM1 bao phủ trên hạt nano vàng là 5 µg/mL và chúng tôi thử nghiệm trong 5 mẫu chuẩn có nồng độ 5 µg/L và thử nghiệm trên 5 mẫu âm tính.

Cường độ tín hiệu màu trên vạch thử nghiệm là không thay đổi sau 3 tháng bảo quản so với 1 tháng, khi sử dụng nồng độ đường 10% Lactose, 10% Sucrose để xử lý màng cộng hợp.

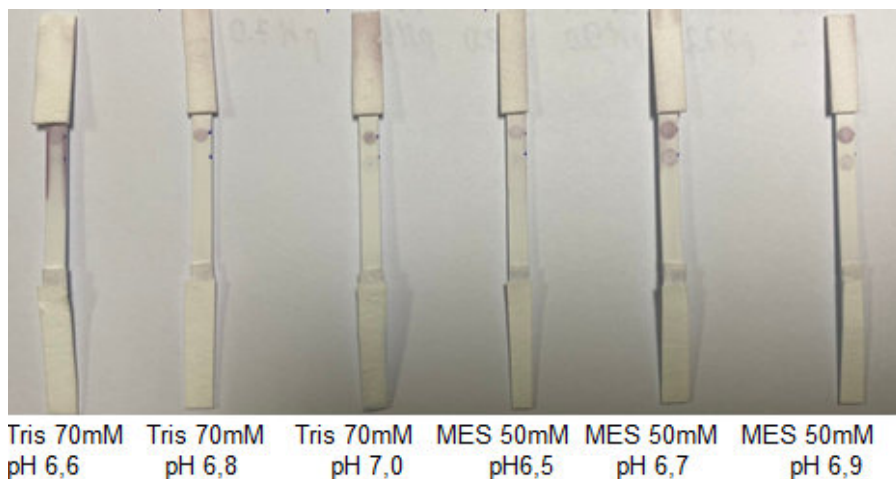
Hơn nữa, không có kết quả dương tính giả và âm tính giả được phát hiện. Việc sử dụng nồng độ đường cao cho thấy tác dụng bảo vệ kháng thể và duy trì tính toàn vẹn của kháng thể hơn so với nồng độ đường thấp. Khi sử dụng nồng độ đường 1% Lactose và 1% Sucrose và 5% Lactose, 5% Sucrose tín hiệu màu ở vạch kiểm tra là nhạt đi khi bảo quản. Do đó, chúng tôi sử dụng đường 10% Lactose, 10% Sucrose trong dung dịch đệm để ổn định kháng thể.



Hình 3. Kết quả quan sát bằng mắt của que thử ở các thời điểm 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng.

Khi sử dụng nồng độ đường 1% Lactose, 1% Sucrose (a), 5% Lactose, 5% Sucrose (b) sau khi bảo quản 3 tháng tín hiệu màu trên vạch kiểm tra giảm so với 1 tháng khi thử nghiệm nồng độ kháng nguyên 0,25 $\mu\text{g/L}$. Trái lại, cường độ màu trên vạch phát hiện là không thay đổi khi xử lý màng cộng hợp bằng 10% Lactose, 10% Sucrose. Điều này chỉ ra rằng có sự ổn định của hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp trong thời gian 3 tháng.

3. Tối ưu hóa dung dịch đệm nhỏ lên que thử



Hình 4. Kết quả thử nghiệm trên mẫu âm tính khi sử dụng 6 loại dung dịch đệm nhỏ lên que thử.

Chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể đơn dòng kháng AFM1 là 5 $\mu\text{g/mL}$ để trải trên màng cộng hợp và dựng thành que thử. Các mẫu âm tính được thử nghiệm bằng 6 loại dung dịch đệm khác nhau. Hình 3 cho thấy khi sử dụng dung dịch đệm là MES (50mM, pH 6,7) thì tín hiệu màu sắc trên vạch kiểm tra là đậm nhất. Đệm MES (50mM, pH 6,9) có tín hiệu màu đậm thứ 2, theo sau là đệm MES (50mM, pH 6,5).

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng dung dịch đệm MES (50mM, pH 6,7) làm tăng tín hiệu màu sắc của que thử vì làm tăng hằng số cân bằng của phản ứng từ đó làm tăng phức hợp kháng nguyên-kháng thể trên vạch kiểm tra.

BÀN LUẬN

1. Tối ưu hóa nồng độ kháng thể nhận diện

Gắn kháng thể lên hạt nano vàng là bước quan trọng nhất trong sản xuất que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh. Có nhiều phương pháp gắn kháng thể lên hạt nano vàng nhưng phương pháp gắn cộng hóa trị có nhiều ưu điểm riêng và có nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng phương pháp này [5]. Phương pháp chúng tôi sử dụng là phương pháp cộng hóa trị đã được

nhiều nghiên cứu trước lựa chọn do sử dụng một lượng nhỏ kháng thể đơn dòng và dễ bắt cặp kháng nguyên.

Kháng thể đơn dòng gắn trên hạt nano vàng có vai trò bắt giữ kháng nguyên AFM1 trong mẫu. Để lựa chọn lượng kháng thể chức hóa lên hạt vàng thích hợp, chúng tôi khảo sát 6 nồng độ: 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$. 6 nồng độ kháng thể được sử dụng để sản xuất que thử để phân tích AFM1. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nếu số phân tử kháng thể bao phủ trên bề mặt hạt vàng là ít sẽ làm giảm ái lực của kháng nguyên và kháng thể và làm tín hiệu màu yếu. Kết quả của chúng tôi cho thấy nồng độ kháng thể thấp nhất đảm bảo phát hiện kháng nguyên ở nồng độ thấp trong khi vẫn giữ được màu sắc của vạch chứng là 5 $\mu\text{g/mL}$.

Nhược điểm của LFIA cạnh tranh là giới hạn phát hiện cao và cường độ tín hiệu màu sắc là thấp trong vùng thử nghiệm, điều này gây khó khăn hơn trong đọc kết quả xét nghiệm. Để cung cấp tín hiệu màu cao hơn, cần tăng nồng độ kháng thể nhận diện bao phủ lên hạt vàng. Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ kháng thể sẽ liên quan đến tăng giới hạn phát hiện.

Thử nghiệm LOD với nồng độ kháng nguyên là 0 $\mu\text{g/L}$; 0,25 $\mu\text{g/L}$; 0,5 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 2 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/L}$, chúng tôi nhận thấy khi nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng là 7,5 $\mu\text{g/mL}$ và nồng độ kháng nguyên là 4 $\mu\text{g/L}$ thì vạch thử nghiệm hoàn toàn mất màu. Do đó, chúng tôi nhận thấy rằng LOD = 4 $\mu\text{g/kg}$ thì không đáp ứng yêu cầu phân tích AFM1, và cần tối ưu hơn về kháng thể bao phủ trên hạt nano vàng.

Khi thử nghiệm nồng độ kháng thể gắn lên hạt nano vàng là 5 $\mu\text{g/mL}$ chúng tôi nhận thấy rằng nồng độ kháng nguyên 0,25 $\mu\text{g/L}$ là nồng độ chất phân tích tối thiểu tạo ra vạch thử nghiệm yếu hơn đáng kể so với mẫu âm tính. Thêm vào đó nồng độ kháng nguyên thấp nhất mà vạch thử nghiệm mất màu là 2 $\mu\text{g/L}$. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể tối ưu bao phủ lên hạt nano vàng là 5 $\mu\text{g/mL}$. Để kiểm tra độ lặp lại của que thử, chúng tôi sử dụng 5 que thử trong 1 lô sản xuất để thử nghiệm LOD = 2 $\mu\text{g/L}$ và quan sát 5/5 mẫu có độ lặp lại. Từ tính nhất quán của kết quả, chúng tôi có thể nhận định rằng các xét nghiệm có đặc điểm giống nhau và có thể phát hiện được độc tố AFM1.

Đối với giới hạn phát hiện của bộ kit, thử nghiệm cho thấy giới hạn phát

hiện là 2 $\mu\text{g/L}$. Chúng tôi thử nghiệm trên dung dịch kháng nguyên chuẩn pha trong dung dịch đệm. Giới hạn phát hiện bộ kit của chúng tôi là cao hơn nhiều so với tác giả Chun Wang [6] và cao hơn một chút so với LOD của tác giả [7]. Nếu so sánh phương pháp phát hiện độc tố AFM1 với các nghiên cứu khác trên thế giới thì giới hạn phát hiện là 2 $\mu\text{g/L}$ chưa phải là tốt nhất. Vì vậy, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu và hy vọng rằng có thể phát triển thành công bộ kit có các ưu điểm tốt hơn trong tương lai.

2. Tối ưu hóa chất ổn định hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp

Để xác định ảnh hưởng của đường đối với tính toàn vẹn và ổn định của kháng thể chúng tôi đã thử nghiệm đường Lactose và Sucrose ở 3 nồng độ khác nhau (1%; 5% và 10%). Sau khi trải kháng thể lên màng cộng hợp, màng được bảo quản ở 25°C trong túi kín có đựng silicagel. Kết quả cho thấy đường Lactose 10% và Sucrose 10% cải thiện đáng kể độ ổn định của kháng thể so với mẫu có nồng độ đường thấp. Đường sucrose, lactose bảo quản cấu trúc tự nhiên của kháng thể khi sấy khô vì góc hydroxyl của phân tử đường sẽ thay thế nước xung quanh kháng thể [8]. Thêm vào đó, khi màng cộng hợp được sấy khô và sự có mặt của đường,

các phân tử đường tạo thành một lớp bao quanh kháng thể do đó giữ được tính toàn vẹn và cấu trúc sinh học của protein [9]. Hơn nữa, làm khô màng cộng hợp là cần thiết để đạt được độ ổn định của kháng thể, vì độ ẩm cao tạo điều kiện thuận lợi cho phân hủy hóa học và vật lý của protein.

3. Tối ưu hóa dung dịch đệm nhỏ lên que thử

Trong khi thử nghiệm trên que thử, chúng tôi nhận thấy rằng khi sử dụng dung dịch nhỏ vào que thử khác nhau thì cường độ tín hiệu trên vạch kiểm tra là khác nhau. Để tăng cường độ tín hiệu màu, dung dịch đệm pha loãng kháng nguyên đã được tối ưu hóa.

Kết quả tối ưu của dung dịch đệm trong nghiên cứu của chúng tôi là MES 50mM, pH 6,7; BSA 0,5%; Tween 20 0,5%. Nghiên cứu hiện tại đã tìm ra dung dịch pha loãng mẫu phù hợp và làm tăng phản ứng kháng nguyên-kháng thể, từ đó tăng độ nhạy của que thử.

Gắn định hướng kháng thể lên hạt nano vàng đã được chứng minh là tăng độ nhạy của que thử sắc ký miễn dịch [10]. Mặc dù LFIA đã được sử dụng rộng rãi, nhưng hầu hết gắn kháng thể lên hạt vàng sử dụng phương pháp gắn ngẫu nhiên thay vì gắn định hướng. Tác giả Kang JH đã chứng minh gắn cố định và định hướng kháng thể có

thể làm tăng hiệu quả bắt cặp kháng nguyên lên gấp 2 lần so với gắn ngẫu nhiên [11]. Thêm vào đó, tác giả Yiseul Ryu đã chứng minh khi sử dụng phương pháp hấp thụ vật lý để gắn kháng thể, số phân tử kháng thể đơn dòng sẽ tăng gấp 3 lần gắn định hướng [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh gắn cố định và định hướng kháng thể lên hạt nano vàng cung cấp được nhiều vị trí Fab để liên kết với kháng nguyên hơn. Thêm vào đó, số phân tử kháng thể đơn dòng khi gắn định hướng chỉ bằng $\frac{1}{2}$ so với gắn ngẫu nhiên.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển que thử sắc ký miễn dịch dòng chảy bên để phát hiện nhanh AFM1. Kết quả cho thấy, nồng độ kháng thể tối ưu hấp thu lên hạt nano vàng là 5 $\mu\text{g/mL}$. Khi xử lý màng cộng hợp bằng dung dịch đệm chứa: Borat pH 7,2; 1% (v/v) Tween 20; BSA 1%; 10% Lactose và 10% Sucrose thì thời gian ổn định của kháng thể là 3 tháng khi bảo quản ở 25⁰C. Dung dịch đệm nhỏ mẫu để tăng cường phản ứng kháng nguyên-kháng thể là MES (50mM, pH 6,7). Từ việc tối ưu hóa các thông số xét nghiệm, chúng tôi bước đầu có thể phát triển được que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh AFM1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2002; 82:1-556.
2. Chun Wang, Juan Peng, Dao-Feng Liu. Lateral flow immunoassay integrated with competitive and sandwich models for the detection of aflatoxin M1 and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J. Dairy Sci.* 2018; 101:1-11.
3. RC Wong, YT Harley. *Lateral Flow Immunoassay*. Springer Science & Business Media. 2009.
4. D Zhang, P Li, Y Yang, et al. A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B1. *Talanta*. 2011; 85:736-742.
5. Zifei Wang, Pengjie Luo. A rapid and sensitive fluorescent microsphere-based lateral flow immunoassay for determination of aflatoxin b1 in distillers' grains. *Foods*. 2021; 10:2109.
6. Chun Wang. Lateral flow immunoassay integrated with competitive and sandwich models for the detection of aflatoxin M1 and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J. Dairy Sci.* 2018; 101:1-11.
7. Umaporn Pimpitak, Sirirat Rengpipat. Development and validation of a lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxin M1 in raw and commercialised milks. *Vol 0 International Journal of Dairy Technology*. 2020.
8. Y Le Basle, P Chennell, N Tokhadze, et al. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A review. *J. Pharm. Sci.* 2020; 109:169-190.
9. Y Yazdani, S Mohammadi, M Yousefi, et al. Preliminary assessment of various additives on the specific reactivity of Anti-rHBsAg monoclonal antibodies. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2015; 7:145-150.
10. HJ Seok, MY Hong, YJ Kim, et al. Mass spectrometric analysis of affinity-captured proteins on a dendrimer-based immunosensing surface: Investigation of on-chip proteolytic digestion. *Analytical Biochemistry*. 2005; 337(2):294-307.
11. JH Kang, HJ Choi, SY Hwang, et al. Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody. *Journal of Chromatography*. 2007; 1161(1-2):9-14.
12. Y Ryu, Z Jin, MS Kang, et al. Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody. *BioChip Journal*. 2011; 5:193-198.