

NGHIÊN CỨU TẠO ĐĨA PHỦ HAPTEN-BSA DÙNG CHO PHÂN TÍCH NHANH DIOXIN BẰNG XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH LIÊN KẾT ENZYME

Đến tòa soạn: 05-09-2023

**Đặng Phương Nam^{1,2}, Nguyễn Văn Hoàng¹, Phạm Kiên Cường¹,
Lê Thị Phương Hoa², Nguyễn Khánh Hoàng Việt^{1*}**

¹*Viện Công nghệ mới/ Viện Khoa học công nghệ Quân sự*

²*Khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

*Email: hoangviet1015@gmail.com

SUMMARY

CREATION COATED PLATE WITH HAPTEN-BSA FOR QUICK ANALYSIS OF DIOXIN BY ENZYME LINK IMMUNOSORBENT ASSAY

Dioxin is one of the organic compounds that are difficult to decompose, causing environmental pollution and long-term effects on human health. The most reliable method for dioxin analysis is high-resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC/HRMS), but requires long analysis time, modern equipment, and high cost. Currently, immunoassay methods have been used to rapidly detect and screen for dioxin contamination in food and the environment. In particular, competitive ELISA is a method with high sensitivity, good signal amplification of low concentrations and can detect many different toxic congeners in the dioxin group. First, the antigen (haptin-BSA) was immobilized on a plate at 4°C overnight. After that, ELISA reaction was performed on the haptin-coated wells, at room temperature. The immobilization step of haptin-BSA onto the plate makes it difficult to analyze in the field, requires strict conditions and prolongs the analysis time. Therefore, the creation of coated plate with haptin-BSA needs to be investigated. In this study, coated plate with haptin-BSA was created with a haptin-BSA concentration of 0.5 µg/mL, using 5% sucrose as a preservative, BSA concentration of blocking buffer is 0.5% and with a TCDD detection threshold of 10 ppt in 12 month of storage. The successful creation of the coated plate with haptin-BSA shortens the analysis time to about 4-5 hours, which is convenient for analysis and get results in the field.

Keywords: Dioxin, competitive ELISA, coated plate with haptin-BSA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dioxin là nhóm các hợp chất được cấu tạo gồm hai vòng benzen clo hoá liên kết với nhau bằng nguyên tử oxy hoặc liên kết cacbon [1]. Với đặc tính kỵ nước và ưa dầu, dioxin có khả năng bám dính cao trên các hạt keo đất và là nhóm các hợp chất có khả năng tích lũy sinh học cao [2]. Dioxin

là sản phẩm phụ không mong muốn của một số ngành công nghiệp (sản xuất giấy, thuốc trừ sâu, luyện kim...) và phát sinh từ các hoạt động thiêu huỷ rác thải hữu cơ chứa clo [1]. Tại Việt Nam, dioxin có mặt trong chất diệt cỏ màu da cam do quân đội Hoa Kỳ sử dụng trong chiến tranh tại miền Nam Việt Nam. Hiện nay, phần lớn các khu vực bị ô nhiễm đã nằm trong ngưỡng thấp. Tuy

nhiên, một số sân bay là nơi trung chuyển, lưu trữ chất da cam vẫn có nồng độ ô nhiễm dioxin trong môi trường và động vật thủy sinh rất cao. Từ đây, dioxin xâm nhập vào chuỗi thức ăn, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe người dân xung quanh khu vực ô nhiễm [3]. Do đó, việc đánh giá mức độ ô nhiễm dioxin nhằm đưa ra thông tin cảnh báo và lựa chọn phương pháp xử lý phù hợp là thực sự cần thiết.

Sắc ký khí ghép khối phổ độ phân giải cao (HRGC/HRMS) từ lâu đã được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong phân tích dioxin nhờ khả năng phát hiện và định lượng 17 hợp chất dioxin độc nhất [4]. Mặc dù vậy, phương pháp này yêu cầu thiết bị hiện đại, trình độ chuyên môn cao, thời gian thực hiện dài và chi phí phân tích đắt đỏ. Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu sử dụng các phương pháp sinh học như một công cụ bổ sung trong đánh giá sàng lọc ô nhiễm dioxin [5]. Trong đó, xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA), đặc biệt là ELISA cạnh tranh, là phương pháp đang được quan tâm và nghiên cứu. ELISA cạnh tranh là phương pháp có khả năng khuếch đại tín hiệu tốt, ngưỡng phát hiện thấp và có khả năng phát hiện nhiều hợp chất dioxin khác nhau [6]. Mẫu chứa dioxin được ủ với một lượng dư kháng thể kháng dioxin trước khi chuyển vào đĩa phủ hapten-BSA. Các kháng thể tự do không liên kết với dioxin được giữ lại trên giếng nhờ liên kết với hapten-BSA, còn các kháng thể liên kết dioxin bị rửa trôi sau bước rửa. Lượng kháng thể kháng dioxin trên đĩa được định lượng gián tiếp thông qua một kháng thể thứ cấp được cộng hợp enzyme. Phản ứng màu của enzyme và cơ chất tạo thành tín hiệu màu đặc trưng. Bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang học của mẫu, lượng kháng thể kháng dioxin có thể được xác định, từ đó gián tiếp xác định lượng dioxin có mặt trong mẫu [7]. Đây là phương pháp đơn giản, nhanh chóng, có độ tin cậy cao. Tuy nhiên, thời gian thực hiện phản ứng ELISA tương đối dài (khoảng 20 giờ) và đòi hỏi các điều kiện nghiêm ngặt trong bước phủ hapten-BSA lên đĩa, đã gây khó khăn trong việc triển khai ngoài thực địa. Vì vậy, cần có những nghiên cứu chế tạo và đánh giá hiệu quả sử dụng của đĩa phủ hapten-BSA, giúp rút ngắn thời gian phân tích dioxin bằng phương pháp ELISA cạnh tranh.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu và hóa chất

Một số hóa chất chính được sử dụng: Chất chuẩn 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) - 48599 (Sigma, Mỹ), kháng thể kháng dioxin từ chuột CABT-L4232 (Creative Diagnostics, Mỹ), kháng thể đa dòng kháng IgG chuột cộng hợp HRP từ dê Ab6789 (Abcam, Anh), dung dịch cơ chất TMB T0440 (Sigma, Mỹ), hapten cộng hợp albumin huyết thanh bò (hapten-BSA) được tổng hợp theo phương pháp của Shan và cộng sự [6].

Các hoá chất pha đệm: NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , H_2SO_4 98% (Merck), albumin huyết thanh bò (BSA), Tween 20, DMSO, Triton X-100 (Sigma), sucrose (Central Drug House, Ấn Độ), H_2O deion.

Một số loại đệm sử dụng: Phosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,78 g/L, KH_2PO_4 0,24 g/L); đệm carbonate - bicarbonate pH 9,6 (Na_2CO_3 1,59 g/L, NaHCO_3 2,93 g/L). Các loại đệm sau khi pha được bảo quản ở 4°C.

2.2. Thiết bị

Đĩa ELISA 96 giếng strip rời (Thermo Fisher, Mỹ), pipete đơn kênh, pipete đa kênh (Eppendorf, Đức). Máy lắc (Elmi, Latvia), máy rửa và máy đọc đĩa ELISA (BioTek, Mỹ). Bình hút chân không (OneLap, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chế tạo đĩa phủ hapten-BSA

Tham khảo phương pháp của Sugawara và cộng sự [8]. Đĩa ELISA được ủ với 100 μL hapten-BSA trong đệm carbonate-bicarbonate pH 9,6 ở 4 °C qua đêm. Sau bước ủ, đổ bỏ dịch, rửa giếng 5 lần bằng 250 μL đệm PBST (PBS bổ sung 0,05 % Tween 20). Giếng được chặn bằng 300 μL dung dịch 0,5 % BSA trong PBS, bổ sung thêm chất bảo quản trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Dịch trong giếng được đổ bỏ, thấm khô bằng giấy thấm. Đĩa được làm khô trong chân không ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, sau đó được đóng gói hút chân không và bảo quản ở 4 °C.

2.3.2. Phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp

Tham khảo theo phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp của Shan và cộng sự. Dung dịch chuẩn được trộn đều với dung dịch kháng thể kháng dioxin bằng vortex (50 μ L mẫu và 50 μ L kháng thể cho mỗi giếng), mỗi mẫu lặp lại 3 lần, sau đó ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng. 100 μ L hỗn hợp dioxin-kháng thể sau bước ủ được bổ sung vào mỗi giếng và lặp lại 3 lần. Các thành phần trong giếng được trộn nhẹ bằng cách di chuyển tròn đều trên mặt bàn trong 30 giây. Đĩa thử nghiệm được ủ ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau khi ủ, đổ bỏ dịch trong giếng, rửa giếng 5 lần bằng đệm PBST. 100 μ L dung dịch kháng thể cộng hợp HRP được bổ sung vào mỗi giếng, trộn nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó rửa giếng 5 lần và thấm khô giếng. Dung dịch cơ chất TMB được bổ sung vào các giếng với thể tích 100 μ L và được ủ ở nhiệt độ phòng trong tối, tránh ánh sáng đến khi chuyển màu xanh. Phản ứng enzyme-cơ chất được dừng lại bằng 100 μ L H_2SO_4 2M. Tín hiệu được đo ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc đĩa ELISA (OD_{450}) [6]. Độ giảm tín hiệu tương đối (B/B_0) được xác định là tỉ số giữa OD_{450} của mẫu TCDD với OD_{450} của mẫu trắng [9].

2.3.3. Phương pháp tối ưu nồng độ hapten-BSA phủ lên đĩa

Đĩa phủ hapten-BSA được chế tạo theo phương pháp mục 2.3.1 với nồng độ hapten-BSA là 0,1, 0,25, 0,5 và 1 (μ g/mL). Đĩa phủ hapten sau khi chế tạo được bảo quản 1 tháng ở 4 °C, sau đó được thực hiện phản ứng ELISA cạnh tranh theo mục 2.3.2 với mẫu trắng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính giá trị OD_{450} trung bình. Nồng độ hapten-BSA tối ưu được lựa chọn là nồng độ mà giá trị OD_{450} tương đương với các nồng độ hapten-BSA cao hơn.

2.3.4. Phương pháp tối ưu nồng độ chất bảo quản cho đĩa phủ hapten-BSA

Sucrose được lựa chọn là chất bảo quản đĩa phủ hapten-BSA với các nồng độ nghiên cứu là 0, 0,5, 5 và 10 (%). Đĩa phủ hapten-BSA sau khi chế tạo được bảo quản lâu hoá cấp tốc ở 37 °C trong 2 tuần, định kỳ kiểm tra hàng tuần bằng phản ứng ELISA cạnh tranh theo mục 2.3.2 với mẫu trắng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính giá trị OD_{450} trung bình. Nồng độ sucrose tối ưu được lựa chọn

là nồng độ mà giá trị OD_{450} tương đương với các nồng độ sucrose cao hơn.

2.3.5. Phương pháp tối ưu nồng độ BSA trong đệm chặn

Dung dịch đệm chặn chứa BSA nồng độ 0, 0,5, 1 và 2 (%) trong đệm PBS được sử dụng để khoá các vị trí liên kết không đặc hiệu. Đĩa phủ hapten-BSA sau khi chế tạo được bảo quản 1 tháng ở 4 °C, sau đó được thực hiện phản ứng ELISA cạnh tranh theo mục 2.3.2 với mẫu trắng và mẫu TCDD nồng độ 10, 50, 250 và 1000 (ppt). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính giá trị OD_{450} trung bình, tỉ lệ B/B_0 . Nồng độ BSA tối ưu được lựa chọn là nồng độ mà tỉ lệ B/B_0 thấp nhất hoặc tương đương với các nồng độ BSA cao hơn.

2.3.6. Phương pháp đánh giá độ ổn định của đĩa phủ hapten-BSA

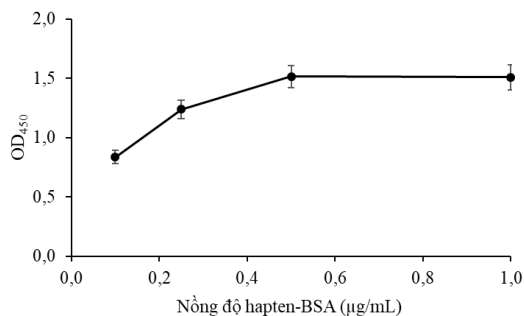
Đĩa phủ hapten-BSA với sucrose 5 % được sử dụng làm chất bảo quản, được bảo quản ở 4 °C trong 12 tháng, định kỳ kiểm tra mỗi 3 tháng bằng phản ứng ELISA cạnh tranh theo mục 2.3.2 với mẫu trắng và mẫu TCDD nồng độ 10, 50, 250 và 1000 (ppt). Mỗi thí nghiệm định kỳ được lặp lại 3 lần và tính giá trị OD_{450} trung bình, tỉ lệ B/B_0 . Ngưỡng phát hiện dioxin là nồng độ dioxin thấp nhất cho tín hiệu khác biệt đối với mẫu trắng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu nồng độ hapten-BSA phủ lên đĩa

Hapten-BSA gồm hai thành phần: bán kháng nguyên (hapten) có cấu trúc gần giống dioxin vì vậy có khả năng liên kết với kháng thể kháng dioxin, phần còn lại là protein mang (BSA) giúp cố định bán kháng nguyên lên bề mặt đĩa, tạo điều kiện để các thành phần còn lại trong phản ứng ELISA liên kết được với nhau và không bị rửa trôi trong các bước rửa đĩa [6]. Hapten-BSA được cố định trên đĩa là bước đầu tiên và quan trọng của phản ứng ELISA. Quá trình phủ hapten-BSA lên đĩa yêu cầu thời gian dài (khoảng 15 giờ) ở điều kiện nhiệt độ 4 °C. Do đó, để thuận tiện cho quá trình phân tích mẫu tại hiện trường và rút ngắn thời gian phân tích, việc chế tạo đĩa khô phủ sẵn hapten-BSA có thể sử dụng ngay cần được nghiên cứu. Nồng độ hapten-BSA cần được khảo sát với các giá trị 0,1, 0,25, 0,5 và 1 μ g/mL. Các đĩa khô

được chế tạo và bảo quản ở 4 °C sau 1 tháng để đánh giá khả năng phát hiện dioxin (Hình 1). Tín hiệu OD₄₅₀ của đĩa khô phủ hapten-BSA tăng lên và đạt giá trị cao nhất ($1,514 \pm 0,092$) tại nồng độ hapten-BSA 0,5 µg/mL.



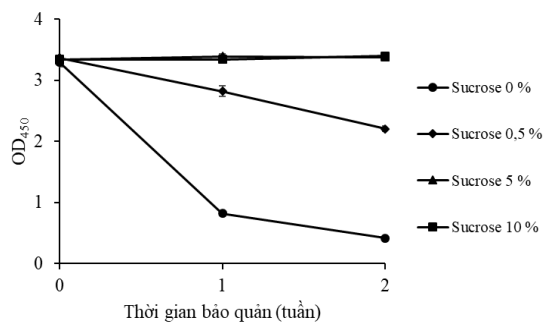
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ hapten-BSA đến tín hiệu của phản ứng ELISA

Do đó, nồng độ hapten-BSA được lựa chọn để phủ lên đĩa ELISA là 0,5 µg/mL. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Sugawara và cộng sự khi đánh giá khả năng sử dụng của đĩa khô phủ hapten-BSA [8], tuy nhiên lại cao hơn nồng độ hapten-BSA được sử dụng trong một số nghiên cứu trước đó [7]. Đĩa khô sau khi chế tạo được bảo quản sau một khoảng thời gian ở 4 °C trước khi sử dụng, do đó, khả năng liên kết của hapten-BSA với kháng thể đã có sự thay đổi. Bên cạnh đó, việc bổ sung sucrose làm chất bảo quản cũng có thể làm cản trở quá trình liên kết của kháng thể và hapten-BSA. Đây có thể là những nguyên nhân khiến cho việc chế tạo đĩa khô cần sử dụng lượng hapten-BSA nhiều hơn so với những nghiên cứu trước.

3.2. Tối ưu nồng độ chất bảo quản cho đĩa phủ hapten-BSA

Hiện nay, các bộ kit phát hiện dioxin thương mại sử dụng đĩa phủ hapten-BSA và các thành phần khác của phản ứng ELISA được chuẩn bị sẵn nhằm tạo sự thuận tiện trong quá trình sử dụng và giảm thời gian phân tích mẫu thực tế. Để kéo dài thời gian sử dụng của đĩa phủ hapten-BSA, chất bảo quản được thêm vào đệm chặn để ổn định cấu trúc và bảo vệ hapten-BSA phủ trên đĩa. Một số nghiên cứu đã chỉ ra khả năng bảo quản protein đông khô của sucrose [10]. Vì vậy, sucrose được lựa chọn làm chất bảo quản đĩa phủ hapten-BSA trong nghiên cứu này. Các bước tạo đĩa phủ hapten-BSA được thực hiện theo quy trình của

Sugawara và cộng sự và được đánh giá độ ổn định bằng phương pháp lão hóa cấp tốc ở 37 °C trong 2 tuần với các nồng độ sucrose 0,5 %, 5 % và 10 % có vai trò là chất bảo quản [8]. Kết quả thu được như Hình 2. Đối với các giếng không có sucrose và các giếng bổ sung sucrose 0,5 % để bảo quản, tín hiệu OD₄₅₀ giảm ngay từ tuần đầu tiên trong quá trình bảo quản. Như vậy, nồng độ sucrose 0,5 % không có tác dụng trong bảo quản đĩa phủ hapten-BSA. Ở các nồng độ sucrose cao hơn (5 % và 10 %), tín hiệu OD₄₅₀ thay đổi không đáng kể và ổn định (OD₄₅₀ khoảng 3,3).



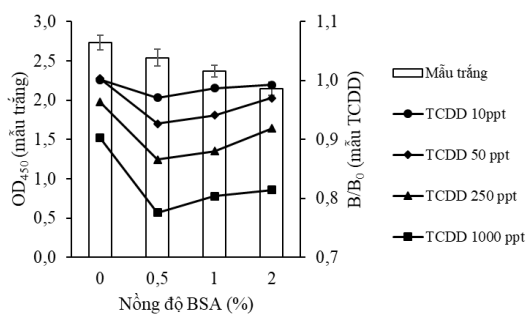
Hình 2. Tín hiệu OD₄₅₀ của đĩa phủ hapten-BSA sau các khoảng thời gian bảo quản khác nhau ở 37 °C

Như vậy, nồng độ sucrose 5% là phù hợp để sử dụng làm chất bảo quản cho đĩa phủ hapten-BSA. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Sugawara và cộng sự khi nghiên cứu nồng độ chất bảo quản cho đĩa phủ hapten-BSA [8].

3.3. Tối ưu nồng độ BSA trong đệm chặn

Albumin từ huyết thanh bò (BSA) được sử dụng trong phản ứng ELISA để khoá các vị trí trống trên đĩa phủ hapten-BSA và hạn chế sự xuất hiện các liên kết không đặc hiệu [6,11]. Việc sử dụng chất chặn các vị trí liên kết không đặc hiệu góp phần ổn định độ nhạy và độ đặc hiệu của đĩa phủ kháng nguyên [12]. Hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng dung dịch đệm chặn là BSA 0,5 % trong đệm PBS [6,7], tuy nhiên một số nghiên cứu lại sử dụng dung dịch BSA 1 % cho bước này [11]. Do đó, nồng độ BSA trong đệm chặn cần được khảo sát với các nồng độ 0, 0,5, 1 và 2 (%) (Hình 3). Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi bổ sung BSA vào dung dịch đệm chặn, giá trị OD₄₅₀ của mẫu trắng giảm dần từ $2,734 \pm 0,092$ khi không sử dụng

BSA trong đệm chặn, đến $1,984 \pm 0,060$ khi bổ sung BSA 2 % trong đệm chặn. Khả năng phát hiện TCDD của đĩa phủ hapten-BSA được đánh giá thông qua độ giảm tín hiệu tương đối (B/B_0). Tỷ lệ B/B_0 càng thấp, sự khác biệt giữa mẫu chứa TCDD so với mẫu trắng càng cao, khả năng phát hiện TCDD của phương pháp ELISA càng cao. Với mỗi nồng độ TCDD, tỷ lệ B/B_0 giảm xuống khi bổ sung BSA 0,5 % trong đệm chặn, và tăng dần ở các nồng độ BSA 1 % và 2 %. Tại nồng độ BSA 0,5 %, tỷ lệ B/B_0 của các mẫu TCDD đạt giá trị thấp nhất là 0,9711, 0,9268, 0,8659 và 0,7762, tương ứng với các nồng độ TCDD 10, 50, 250 và 1000 (ppt).



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ BSA trong đệm chặn đến khả năng phát hiện TCDD của đĩa phủ hapten-BSA

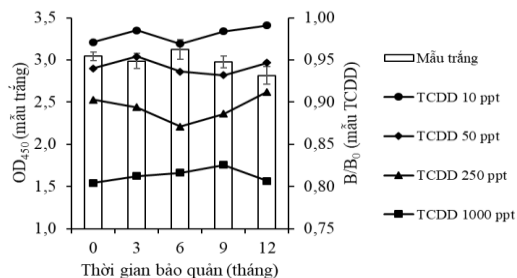
Trong thí nghiệm này, nồng độ BSA 0,5 % được lựa chọn để chặn các vị trí liên kết không đặc hiệu trước khi tiến hành phản ứng ELISA. Kết quả này cũng tương tự các nghiên cứu của Shan và Sugawara khi lựa chọn nồng độ BSA trong đệm chặn là 0,5 % [6,7].

3.4. Đánh giá độ ổn định của đĩa phủ hapten-BSA

Những nghiên cứu của Rokni và cộng sự năm 2010 đã cho thấy khả năng bảo quản của đĩa phủ kháng nguyên *Fasciolosis* khi được chặn bằng gelatin ở 4 °C là có thể thực hiện được trong khoảng 12 tháng với độ nhạy và độ đặc hiệu cao [12]. Do đó, nhiệt độ bảo quản đĩa phủ hapten-BSA được lựa chọn là 4 °C. Đĩa ELISA được phủ hapten-BSA 0,5 µg/mL, sử dụng sucrose 5 % là chất bảo quản. Sau các bước làm khô và đóng gói chân không, đĩa phủ hapten được bảo quản trong nhiệt độ 4 °C trong 12 tháng. Hình 4 thể hiện khả

năng phát hiện dioxin của đĩa khô sau mỗi 3 tháng với các nồng độ TCDD khác nhau.

Sau 12 tháng bảo quản tại 4 °C, tín hiệu OD₄₅₀ của các mẫu trắng nằm trong khoảng 2,8 đến 3,0. Khả năng phát hiện TCDD được xác định là nồng độ TCDD nhỏ nhất mà tín hiệu OD₄₅₀ của mẫu TCDD có sự khác biệt đối với mẫu trắng. Tại nồng độ TCDD 10 ppt, sự khác biệt giữa mẫu TCDD và mẫu trắng là nhỏ nhất với tỷ lệ B/B_0 cao nhất (trong khoảng 0,9915 đến 0,9715), tuy nhiên vẫn có sự khác biệt khi so sánh với mẫu trắng. Đối với các nồng độ TCDD cao hơn, tỷ lệ B/B_0 cũng tương đối ổn định, dao động trong các khoảng 0,9321 - 0,9540 (đối với mẫu TCDD 50 ppt), 0,8716 - 0,9125 (đối với mẫu TCDD 250 ppt) và 0,8042 - 0,8256 (đối với mẫu TCDD 1000 ppt). Do đó, phản ứng ELISA cạnh tranh sử dụng đĩa phủ hapten-BSA vẫn có thể phát hiện được TCDD ở nồng độ 10 ppt.



Hình 4. Khả năng phát hiện TCDD của đĩa phủ hapten-BSA bảo quản ở 4 °C

Như vậy, sau 12 tháng bảo quản, đĩa phủ hapten-BSA vẫn có khả năng phát hiện TCDD ở các nồng độ khác nhau, với nồng độ TCDD thấp nhất có thể phát hiện được là 10 ppt.

Theo khảo sát của nhóm nghiên cứu, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu về sử dụng phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp trong việc phát hiện ô nhiễm dioxin, cũng như đánh giá độ ổn định của đĩa phủ hapten-BSA. Kit xét nghiệm dioxin thương mại đã được đánh giá và cho kết quả có độ tin cậy cao, đáp ứng được yêu cầu phân tích mẫu đất ô nhiễm dioxin tại Việt Nam [13], tuy nhiên giá thành cao và một số sản phẩm thương mại đã ngừng cung cấp trên thị trường. Do đó, đĩa ELISA được chế tạo có độ ổn định giúp làm chủ công nghệ chế tạo bộ kit phát hiện nhanh dioxin và

cung cấp một công cụ mới trong đánh giá sàng lọc ô nhiễm dioxin.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, đĩa ELISA phủ hapten-BSA đã được chế tạo thành công và sẵn sàng sử dụng cho phân tích ELISA tại hiện trường, giúp đơn giản hoá quy trình và giảm bớt thời gian phân tích. Một số điều kiện của quy trình chế tạo đĩa phủ hapten-BSA đã được tối ưu: nồng độ hapten-BSA phủ đĩa là 0,5 µg/mL, nồng độ BSA trong đệm chặn là 0,5 % và nồng độ chất bảo quản (sucrose) là 5 %. Đánh giá độ ổn định của đĩa phủ hapten-BSA tại điều kiện bảo quản 4 °C trong 12 tháng cho thấy khả năng phát hiện dioxin của đĩa phủ hapten-BSA tương đối ổn định và có thể phát hiện TCDD nồng độ 10 ppt.

5. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Bộ Quốc phòng: “Nghiên cứu làm chủ công nghệ chế tạo bộ kit phát hiện nhanh chất độc hoá học/dioxin trong môi trường và công nghệ xử lý đất nhiễm chất độc hoá học/dioxin bằng giải pháp kết hợp chế phẩm sinh học với vật liệu nano”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Prashant K.S., (2019). Dioxin, Encyclopedia of Environmental Health, 2nd edition, pp. 125-134.
- [2] Stockholm Convention, (2018). Persistent Organic Pollutents (POPs). Secretariat of the Stockholm Convention. Geneva: United Nations Environment Programme.
- [3] Văn phòng 701, Bộ Quốc phòng, Học Viện Quân y, (2018). Kỷ yếu hội thảo quốc tế về khắc phục hậu quả của đất da cam/dioxin đối với con người và môi trường, 298.
- [4] United States Environmental Protection Agency, (1994). Region II Method 1613B: CDDs/CDFs by isotope Dilution using HRGC/HRMS.
- [5] Tian W., Xie H.Q., Fu H., Pei X., Zhao B., (2012). Immunoanalysis methods for the detection of dioxins and related chemicals. *Sensors* (Basel) **12**(12), 16710-31.
- [6] Shan G., Leeman W.R., Gee S.J., Sanborn J.R., Jones A.D., Chang D.P.Y., Hammock B.D., (2001). Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota sample. *Analytica Chimica Acta*, **444**, 169-178.
- [7] Sugawara Y., Gee S.J., Sanborn J.R., Gilman S.D., and Hammock B.D., (1998). Development of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Polyclonal Antibodies for the Detection of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins. *Anal Chem.*, **70**, 1092-1099.
- [8] Sugawara Y., Ishizuka M., Saito K. and Nakazawa H., (2010). Improvement of the long-term stability for dioxin toxicity evaluation method by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay Immunochem*, **31**, 111-119.
- [9] Lasrado J.A., Santerre C.R., Zajicek J.L., Stahl J. R., Tillitt D.E., and Deardorff D., (2003). Determination of PCBs in Fish Using Enzymelinked Immunosorbent Assay (ELISA). *JFS*, **68**(1), 133-136.
- [10] Chang L.L., Shepherd D., Sun J., Ouellette D., Grant K.L., Tang X.C., Pikal M.J., (2005). Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?. *J Pharm Sci.*, **94**(7), 1427-44.
- [11] Trần Thị Thanh Quỳnh, Nguyễn Khánh Hoàng Việt, Nguyễn Thị Nhung, Tô Lan Anh, Nghiêm Ngọc Hoa, Bùi Trung Hiếu, (2020). Nghiên cứu thăm dò phát hiện dioxin bằng phương pháp sandwich ELISA. *TC Nghiên cứu KHCNQS*, **66**(4), 123-130.
- [12] Rokni M.B., Aryaeipour M., Koosha S., Rahimi M.T., (2010). Evaluation of the Stability of Coated Plates with Antigen at Different Temperatures and Times by ELISA Test to Diagnose Fasciolosis. *Iranian J Parasitol*, **5**(1), 41-46.
- [13] Nguyễn Thị Minh Huệ, Hoàng Thị Liên, Nguyễn Thị Hà Phương, Lê Thị Hải Châu, Nguyễn Như Tùng, Nguyễn Thị Nguyệt Ánh, Nguyễn Hùng Minh, (2021). Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích tổng dioxin trong đất bằng phương pháp thử nghiệm miễn dịch Immunoassay tại Việt Nam. *Tạp chí Môi trường*, **CD3**, 78-82.