

lên như một phương pháp đầy hứa hẹn trong điều trị ung thư, mang lại hy vọng mới cho những bệnh nhân mắc nhiều loại ung thư khác nhau. Những điểm chính của chủ đề này bao gồm:

**Liệu pháp miễn dịch:** Liệu pháp miễn dịch khai thác sức mạnh của hệ thống miễn dịch để nhận biết và tấn công các tế bào ung thư. Không giống như các phương pháp điều trị truyền thống như hóa trị và xạ trị, nhằm trực tiếp vào tế bào ung thư, liệu pháp miễn dịch giúp tăng cường khả năng phòng vệ tự nhiên của cơ thể chống lại ung thư.

**Các loại liệu pháp miễn dịch:** Có một số loại liệu pháp miễn dịch, bao gồm thuốc ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, chuyển tế bào nuôi dưỡng, cytokine và vắc xin ung thư. Mỗi loại hoạt động theo những cách khác nhau để kích thích hoặc tăng cường phản ứng miễn dịch chống lại bệnh ung thư.

**Điểm nổi bật:** Liệu pháp miễn dịch đã cho thấy thành công đáng kể trong việc điều trị một số loại ung thư, bao gồm khối u ác tính, ung thư phổi, ung thư bàng quang và một số loại bệnh bạch cầu và ung thư hạch. Ví dụ, các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch như pembrolizumab và nivolumab đã cách mạng hóa việc điều trị khối u ác tính và một số loại ung thư phổi.

**Những thách thức và hạn chế:** Bất chấp những hứa hẹn của nó, liệu pháp miễn dịch không có tác dụng với tất cả bệnh nhân hoặc tất cả các loại ung thư. Khả năng kháng trị, tác dụng phụ liên quan đến miễn dịch và chi phí cao là một số thách thức liên quan đến liệu pháp miễn dịch. Ngoài ra, việc xác định các dấu ấn sinh học

dự đoán để xác định bệnh nhân nào sẽ được hưởng lợi nhiều nhất từ liệu pháp miễn dịch vẫn là một thách thức đáng kể.

**Định hướng trong tương lai:** Nghiên cứu về liệu pháp miễn dịch tiếp tục phát triển nhanh chóng, với những nỗ lực không ngừng nhằm cải thiện kết quả điều trị và mở rộng việc sử dụng liệu pháp miễn dịch cho nhiều loại ung thư hơn. Các liệu pháp kết hợp, phương pháp y học cá nhân hóa và những tiến bộ trong việc tìm hiểu môi trường vi mô khối u là các lĩnh vực đang được nghiên cứu tích cực.

Nhìn chung, nên xem xét liệu pháp miễn dịch trong bệnh ung thư vì cả những tiến bộ đáng kể đã đạt được cũng như những thách thức còn tồn tại trong việc khai thác hệ thống miễn dịch để điều trị ung thư một cách hiệu quả.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Coley WB.** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; 105:487.
- Gras Navarro A, Björklund AT, Chekenya M.** Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front Immunol* 2015; 6:202.
- Savage PA, Leventhal DS, Malchow S.** Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2014; 259:245.
- Marvel D, Gabrilovich DI.** Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* 2015; 125:3356.
- Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, et al.** Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 2014; 5:276.

## NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN KIT MIỄN DỊCH PHÁT HIỆN NHANH PATULIN TRONG THỰC PHẨM QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Nguyễn Thế Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Chuyên<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Ba<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Xác định một số thông số kỹ thuật của que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Patulin. **Phương pháp nghiên cứu:** 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 bao phủ lên hạt nano vàng là 20 µg/ml; và dung dịch đệm là MES (50mM, pH 6.7). Độ ổn định của kháng thể trên màng cộng hợp là 3 tháng. **Kết luận:** Bằng cách tối ưu nồng độ kháng thể gắn lên hạt nano vàng, tối ưu hóa xử lý màng cộng hợp, tối ưu dung dịch nhỏ mẫu chúng tôi đã phát triển được que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Patulin. **Từ khóa:** que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh; LFIA; gắn kháng thể; Patulin

<sup>1</sup>Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thế Anh

Email: nguyentheanhqy1@gmail.com

Ngày nhận bài: 14.3.2024

Ngày phản biện khoa học: 24.4.2024

Ngày duyệt bài: 29.5.2024

### SUMMARY

#### RESEARCH TO DEVELOP LATERAL FLOW IMMUNOASSAYS FOR RAPID DETECTION

**OF PATULIN IN FOOD AT LABORATORY SCALE**

**Objectives:** Determine some technical parameters of Lateral flow immunoassay for rapid detection of Patulin. **Methods:** Optimal parameters include: concentration of 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 is 20 µg/ml; and running buffer is MES (50mM, pH 6.7). The stability of the antibody on the conjugate membrane is 3 months. **Conclusions:** By optimizing the optimal 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 Patulin. **Keywords:** Lateral flow immunoassay; LFIA; Patulin

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Patulin là một loại độc tố của nấm mốc và gây lo ngại về vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm. Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế phân loại Patulin là chất gây độc nhóm 3 và có khả năng gây ung thư [1]. Patulin có độc tính rộng và có liên quan đến phơi nhiễm cấp tính và mãn tính ở người. Để bảo vệ sức khỏe cho con người, việc phát hiện thực phẩm bị nhiễm độc tố nấm mốc là cần thiết.

Một số phương pháp phân tích để xác định Patulin bao gồm: sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC high-performance liquid chromatography), xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme (ELISA Enzyme-linked immunosorbent). Trong số các phương pháp xét nghiệm nhanh để sàng lọc mức độ nhiễm của chất cần phân tích, thì xét nghiệm sắc ký miễn dịch dòng chảy bên (LFIA Lateral flow immunoassay) đã được sử dụng nhiều để phân tích độc tố nấm mốc.

Do tính ưu việt của phương pháp LFIA nên hiện nay đã có một số nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện theo phương pháp này và đã tạo ra một số KIT thương mại để phát hiện độc tố vi nấm. Theo tìm hiểu của nhóm nghiên cứu, hiện nay tại Việt Nam hoàn toàn chưa có công trình nghiên cứu nào về phát triển KIT phát hiện nhanh Patulin trong nước. Do vậy đề tài này được xem như công trình nghiên cứu mới tại Việt Nam.

Mục tiêu trong nghiên cứu của chúng tôi là xác định một số thông số kỹ thuật để chế tạo que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Patulin.

**II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất nghiên cứu**

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

Vật liệu nghiên cứu: Độc tố nấm mốc Patulin

Hóa chất: Protein BSA (bovine serum albumin) (Sigma); kháng thể đơn dòng kháng Patulin (GMP-SMT-161-1; Genemedi); kháng thể kháng chuột (M5899; Sigma; Germany); kháng nguyên Patulin-OVA (Genemedi); kháng nguyên Patulin (Sigma). Các hóa chất dùng trong tạo cộng hợp: hạt nano vàng; các loại dung dịch đệm Borat; TBS; PBS, MES được mua từ Sigma; Germany. Các hóa chất dùng trong xử lý màng: Tween 20; đường sucrose, lactose, được mua từ Sigma; Germany. Hạt nano vàng 20nm (ab269935) được mua từ abcam. Màng nitrocellulose (FF120HP whatman; USA); màng cộng hợp (Standard 17 whatman; USA); màng hút mẫu và màng hút trên (CF4 whatman; USA).

Phạm vi nghiên cứu: chế tạo que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Patulin quy mô phòng thí nghiệm

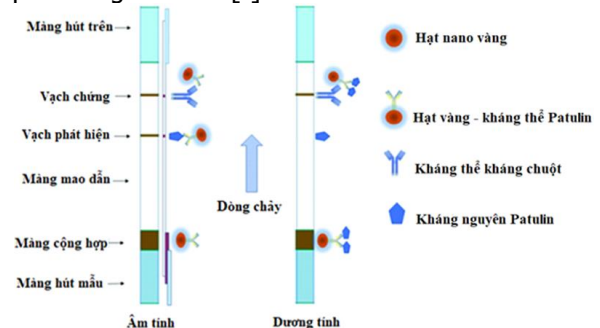
**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

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

**2.2.1. Nguyên tắc của phương pháp.**

Tham khảo từ tác giả Wong R. C chúng tôi xây dựng lên quy trình chế tạo bộ xét nghiệm nhanh phát hiện độc tố nấm mốc Ochratoxin A [2].

Sơ đồ của LFIA cạnh tranh được thể hiện trong hình 1. Cơ chế LFIA dựa trên sự cạnh tranh của kháng nguyên Patulin có trong mẫu thử nghiệm với kháng nguyên được trải trên màng nitrocellulose. Với sự có mặt của kháng nguyên Patulin, phức hợp hạt vàng-kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên có trong mẫu và không thể phản ứng với kháng nguyên được cố định tại vạch phát hiện. Nếu không xuất hiện vạch phát hiện thì đây là mẫu dương tính. Trong trường hợp không có kháng nguyên Patulin, phức hợp hạt vàng-kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên ở vạch phát hiện. Sự xuất hiện của vạch phát hiện trong thời gian 10 phút, đánh giá đây là phản ứng âm tính [2].



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

### 2.2.2. Tối ưu hóa gắn kháng thể lên hạt nano vàng

Tối ưu hóa nồng độ kháng thể nhận diện

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 cạnh tranh, mật độ kháng thể tăng lên trên bề mặt hạt nano 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 (limit of detection-giới hạn phát hiện) 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 Patulin khác nhau được thêm vào với nồng độ là: 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 12,5 µg/ml; 15 µg/ml; 17,5 µg/ml; 20 µg/ml; 22,5 µg/ml trong 100 µl hạt nano vàng OD 25. Hạt nano vàng gắn kháng thể sau đó được blocking bằng BSA 2% trong 1 giờ.

Nồng độ kháng nguyên Patulin chuẩn được khảo sát là: 0 µg/l; 1 µg/l; 2 µg/l; 10 µg/l; 20 µg/l; 40 µg/l. Mỗi nồng độ được phân tích 5 lần trên que thử để xác định LOD. Giới hạn phát hiện của LFIA được hiểu là nồng độ thấp nhất của kháng nguyên mà vạch phát hiện hoàn toàn không nhìn thấy. Thêm vào đó, chúng tôi xác định nồng độ chất phân tích tối thiểu tạo ra tín hiệu màu sắc trên vạch phát hiện yếu hơn đáng kể so với mẫu âm tính.

Sau khi gắn 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 LOD là nồng độ kháng nguyên thấp nhất mà vạch phát hiện mất màu hoàn toàn.

**2.2.3. 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. Dung dịch đệm xử lý màng cộng hợp 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 chuẩn có chứa kháng nguyên Patulin nồng độ 20 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 [3]. 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 20 µg/kg của mẫu dương tính.

**2.2.4. 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. 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.

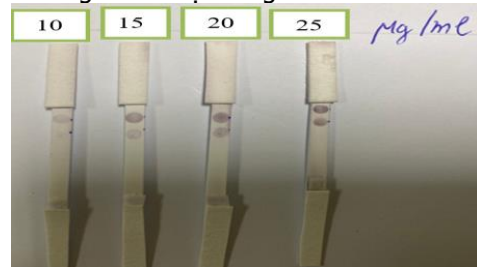
Lựa chọn dung dịch đệm tối ưu: dung dịch nhỏ vào que thử có cường độ màu trên vạch kiểm tra là đậm nhất trong cùng một nồng độ 1 µg/l của mẫu dương tính. Mỗi thông số chúng tôi làm lại 5 lần để kiểm tra độ lặp lại của thử nghiệm.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

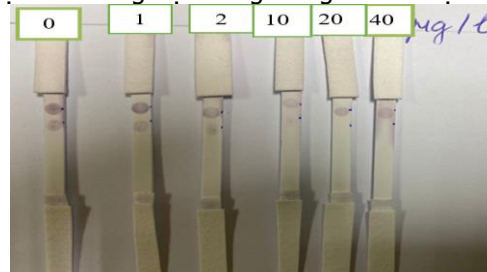
### 3.1. Tối ưu hóa gắn kháng thể lên hạt nano vàng

Tối ưu hóa nồng độ kháng thể nhận diện

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



(a) Cường độ màu ở vùng phát hiện phụ thuộc vào nồng độ kháng thể gắn trên hạt nano vàng



(b) que thử với vạch kiểm tra (ở trên) và vạch phát hiện (ở dưới). Nồng độ mẫu chuẩn

Patulin là 0 µg/l; 1 µg/l; 2 µg/l; 10 µg/ml; 20 µg/l; 40 µg/l

**Hình 3.1. Hình ảnh que thử về nồng độ của hạt vàng-kháng thể: 10 µg/ml ;15 µg/ml; 20 µg/ml; 25 µg/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 phát hiện và vạch kiểm tra là đậm hơn. Nồng độ kháng thể mà nhìn rõ vạch phát hiện và vạch đối chứng là 20 µg/ml (cỡ mẫu n=5, độ lặp lại của thử nghiệm là 5/5 mẫu). Do đó chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể bao phủ lên hạt vàng là 20 µg/ml.

Chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể bao

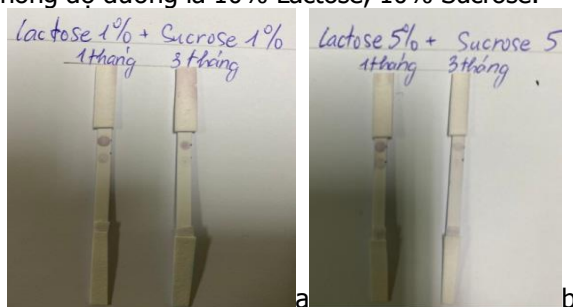
**Bảng 1: Kết quả ổn định hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp**

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	Am tính giả (%)	Dương tính giả (%)	Số mẫu đạt	Cường độ màu trên vạch phát hiện	Am 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	++

Chú ý: "++": cường độ màu đỏ đậm. "+": cường độ màu nhạt. "-": không màu

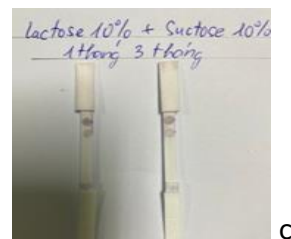
Nồng độ kháng thể đơn dòng Patulin bao phủ trên hạt nano vàng là 20 µg/ml và chúng tôi thử nghiệm trong 5 mẫu chuẩn có nồng độ 20µg/l và thử nghiệm trên 5 mẫu âm tính.

Cường độ tín hiệu màu trên vạch phát hiện 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. Điều này chỉ ra rằng có sự ổn định của hạt vàng-kháng thể trên màng cộng hợp trong thời gian 3 tháng khi xử lý màng cộng hợp ở nồng độ đường là 10% Lactose, 10% Sucrose.



phủ lên hạt nano vàng là 20 µg/ml để kiểm tra giới hạn phát hiện của que thử. Nồng độ kháng nguyên Patulin được phân tích trong hình 1b. Kết quả nghiên cứu cho thấy cường độ vạch phát hiện giảm khi nồng độ kháng nguyên tăng. Ở nồng độ mẫu chuẩn của Patulin là 1 µg/l tạo ra sự khác biệt rõ rệt về cường độ màu của vạch phát hiện giữa mẫu dương tính và mẫu âm tính. Ở nồng độ kháng nguyên 20 µg/l là nồng độ thấp nhất mà vạch phát hiện hoàn toàn không nhìn thấy. Vậy giới hạn phát hiện của que thử trong nghiên cứu của chúng tôi là 20 µg/l (cỡ mẫu n=5, độ lặp lại của thử nghiệm là 5/5 mẫu).

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



**Hình 3.2. 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 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.

**3.3. Tối ưu hóa dung dịch đệm nhỏ lên que thử**



**Hình 3.3. Kết quả thử nghiệm trên mẫu có nồng độ 1 µg/l khi sử dụng 6 loại dung dịch đệm pha loãng kháng nguyên**

Chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng thể đơn dòng kháng Patulin là 20 µg/ml để trải trên màng cộng hợp và dựng thành que thử. Các mẫu thêm dung dịch chuẩn có nồng độ là 1 µg/l được thử nghiệm bằng 6 loại dung dịch đệm khác nhau. Hình 3 cho thấy khi sử dụng dung dịch đệm là MES (50 mM, pH 6.7) thì tín hiệu màu sắc trên vạch kiểm tra là đậm nhất. Đệm MES (50 mM, pH 6.9) có tín hiệu màu đậm thứ 2.

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng dung dịch đệm MES (50 mM, 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 (cỡ mẫu n=5, độ lặp lại của thử nghiệm là 5/5 mẫu).

#### IV. BÀN LUẬN

**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. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nếu số phân tử kháng thể bao phủ trên bề mặt hạt nano vàng 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 kiểm tra là 20 µg/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 = 20 µg/l và quan sát 5/5 mẫu có độ lặp lại. Thời gian phản ứng của que thử là 10 phút. 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 Patulin.

Đối với giới hạn phát hiện của bộ KIT, thử nghiệm cho thấy giới hạn phát hiện là 20 µg/l. Chúng tôi thử nghiệm trên dung dịch kháng nguyên chuẩn pha trong dung dịch đệm. 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.

**Tối ưu hóa chất ổn định hạt nano 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 gốc hydroxyl của phân tử đường sẽ thay thế nước xung quanh kháng thể [4]. 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.

**Tối ưu hóa dung dịch đệm nhỏ lên que thử.** Trong khi thử nghiệm, 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. Hơn nữa, nếu dung dịch đệm pha loãng kháng nguyên không phù hợp có thể làm giảm cường độ tín hiệu màu sắc trên test line khi thử nghiệm trên mẫu có nồng độ 1µg/ml.

Kết quả tối ưu của dung dịch đệm trong nghiên cứu của chúng tôi là MES 50 mM, 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.

**Hạn chế trong nghiên cứu** của chúng tôi là chúng tôi sử dụng dung dịch chuẩn gốc để thử nghiệm. Trong nghiên cứu tiếp theo để đánh giá độ nhạy, chúng tôi sẽ sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để phân tích Patulin trong thực phẩm và so sánh kết quả HPLC với LFIA.

#### V. KẾT LUẬN

Kết quả phát triển LFIA để phát hiện nhanh Patulin cho thấy, nồng độ kháng thể tối ưu hấp thu lên hạt nano vàng là 20 µg/ml. Dung dịch đệm xử lý màng cộng hợp là: 10% Lactose và 10% Sucrose thì thời gian ổn định của kháng thể là 3 tháng khi bảo quản ở 25°C. Dung dịch đệm nhỏ mẫu là MES (50 mM, pH 6.7). Từ việc tối ưu hóa các thông số xét nghiệm chúng tôi bước đầu có thể phát triển được việc chế tạo que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh Patulin.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 2002, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82:1-556
2. **Wong R. C., Harley Y. T.** (2009), Lateral Flow Immunoassay, Springer Science & Business Media.
3. **D.Zhang; P.Li; Y.Yang et al**, 2011, A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B1. Talanta, 85:736-742.
4. **Y.Le Basle, P.Chennell, N.Tokhadze, et al**, 2020, Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. J. Pharm. Sci., 109:169-190.