

Nghiên cứu phát triển hệ thống sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh các độc tố ruột tụ cầu trong sữa

Trần Thị Sao Mai^{1,*}, Nguyễn Thị Khánh Trâm², Lê Quang Hòa³

¹Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

²Viện Dinh dưỡng Quốc gia

³Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

Nhận ngày 8 tháng 01 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 01 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 3 năm 2015

Tóm tắt: Các độc tố ruột của tụ cầu là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây ngộ độc thực phẩm trên thế giới. Mục tiêu của nghiên cứu này là tạo que thử phát hiện nhanh và đồng thời các độc tố ruột tụ cầu thường gặp, bao gồm SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE trong sữa dựa vào kỹ thuật sắc ký miễn dịch cạnh tranh. Để đạt mục tiêu này, độc tố ruột tụ cầu SEC₁ được sản xuất và tinh sạch bằng con đường tái tổ hợp và sau đó được cố định lên hạt nano cac bon để tạo cộng hợp phát hiện. Bên cạnh đó, kháng thể đa dòng IgY kháng các độc tố ruột tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE) và IgY kháng Bovine serum albumin (BSA) cũng được tạo ra và tinh sạch trước khi được in lên vạch thử nghiệm và vạch kiểm chứng của que thử sắc ký miễn dịch cạnh tranh. Các kết quả nghiên cứu về việc sản xuất SEC₁ trong tế bào *Escherichia coli* BL21 đã chỉ ra rằng điều kiện thích hợp để thu nhận độc tố này là nuôi lắc 150 vòng/phút ở 30°C; nồng độ chất cảm ứng isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) là 0,5 mM; thời gian cảm ứng là 8 giờ. Các thông số thích hợp để tạo que thử cũng đã được xác định là: lượng kháng thể IgY kháng các độc tố ruột tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE) cần cố định tại vạch thử nghiệm là 0,6 μg/que thử có độ rộng 4 mm; lượng kháng nguyên cộng hợp cần sử dụng là 2 μl. Ngưỡng phát hiện của que thử đối với các độc tố SEA, SEB và SED trong sữa là 30 ng/ml; đối với SEC₁ và SEE là 9 ng/ml. Toàn bộ thời gian phân tích diễn ra trong 30 phút.

Từ khóa: Độc tố ruột tụ cầu, kỹ thuật sắc ký miễn dịch, sữa, que thử.

1. Đặt vấn đề

Nguyên nhân ngộ độc thực phẩm do tụ cầu là người bị ngộ độc đã tiêu thụ các độc tố ruột tụ cầu (staphylococcal enterotoxin - SE) tồn tại sẵn trong thực phẩm, do các chủng tụ cầu có coagulase dương tính, đặc biệt là tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) tổng hợp nên. Cho đến

nay, 22 loại độc tố ruột tụ cầu đã được thống kê bao gồm các độc tố có hoạt tính gây nôn và các protein giống độc tố ruột tụ cầu chưa được kiểm tra hoạt tính gây nôn [1]. Trong số các độc tố ruột tụ cầu trên, 5 loại độc tố ruột tụ cầu bao gồm SEA, SEB, SEC, SED và SEE được biết là nguyên nhân chủ yếu gây ngộ độc thực phẩm. Theo thống kê ở Anh từ năm 1969 đến 1990, 79% các ca ngộ độc thực phẩm có nguyên nhân do độc tố ruột tụ cầu: chỉ tính riêng độc tố SEA

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-936391579.
Email: t.saomai@yahoo.com.vn

đã gây ra 56,9% các vụ ngộ độc thực phẩm, cả hai độc tố SEA và SED (15,4%), SEB (3,4%), SEC (2,5%), cả SEB và SED (1,1%) [2].

Hiện nay, để phát hiện độc tố ruột tụ cầu, người ta thường sử dụng các sinh phẩm thương mại dựa trên kỹ thuật ELISA như RIDASCREEN SET (R-Biopharm, Darmstadt, Đức) và VIDAS (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Pháp) [3]. Những sinh phẩm này thường sử dụng kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng từ thỏ, từ chuột [4]. Tuy nhiên, vùng Fc của kháng thể IgG từ thỏ và chuột phản ứng mạnh và không đặc hiệu với protein A của *S. aureus* nên có thể gây ra hiện tượng dương tính giả khi sử dụng các bộ sinh phẩm này [4]. Mặt khác, giá thành sinh phẩm cao, thời gian xét nghiệm thường kéo dài từ 2 đến 3 giờ và yêu cầu kỹ thuật viên có trình độ cũng là các yếu tố hạn chế sự ứng dụng của các sinh phẩm này ở Việt Nam.

Do vậy, cần phát triển một phương pháp phân tích sàng lọc mới, có giá thành thấp, thời gian phân tích ngắn, thực hiện đơn giản và tránh được hiện tượng dương tính giả do sự có mặt của protein A. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu chế tạo que thử phát hiện nhanh đồng thời năm loại độc tố ruột tụ cầu thường gặp là SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE trong sữa dựa trên kỹ thuật sắc ký miễn dịch cạnh tranh sử dụng kháng thể đa dòng IgY do chúng tôi tự sản xuất. Ưu điểm cơ bản của kháng thể IgY so với IgG là có thể sản xuất với liều lượng lớn, giá thành rẻ và đặc biệt là không có phản ứng với protein A [5].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid pGS-21a-sec₁ chứa gen mã hóa độc tố ruột C₁

của tụ cầu (SEC₁) được cung cấp bởi phòng Công nghệ Gen, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội. Các độc tố ruột tụ cầu chuẩn SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE có nguồn gốc từ Toxin Technology, Mỹ. Các hóa chất tinh khiết khác có nguồn gốc từ Sigma.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Biểu hiện và tinh sạch protein SEC₁ tái tổ hợp

Trong một nghiên cứu khác, chúng tôi đã tạo được dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid pGS-21a-sec₁ biểu hiện SEC₁ ở trạng thái dung hợp với đuôi His (kết quả chưa công bố).

Để sản xuất SEC₁ tái tổ hợp trong *E. coli*, dòng tế bào chuyển gen được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung thêm 100 mg/l ampicillin. Canh trường được nuôi ở 30°C hoặc 37°C trong điều kiện lắc 150 vòng/phút cho đến khi OD_{600nm} khoảng 0,8 thì bổ sung chất cảm ứng IPTG và tiếp tục nuôi cấy ở cùng điều kiện. Để thu hồi sinh khối, 10 ml canh trường được ly tâm ở 10000 g trong 5 phút. Sau khi loại bỏ dịch nổi, 1 ml dung dịch PBS được bổ sung vào ống và tiến hành siêu âm trong đá với máy VCX130 trong 1 phút với chế độ siêu âm 10 giây, nghỉ 30 giây, công suất tối đa 130W. Sau khi ly tâm, dịch protein thô chứa SEC₁ được tinh sạch bằng Kit His Mag Sepharo™Ni (GE Healthcare) bởi đệm liên kết (20mM Sodium Phosphate pH 7,4: 500mM NaCl, 30 mM imidazole) và đệm rửa giải (20mM Sodium Phosphate pH 7,4: 500 mM NaCl: 500 mM imidazole).

Protein tái tổ hợp được kiểm tra điện di biến tính protein SDS-PAGE (12,5%), tiến hành theo các phương pháp của Laemmli [6].

2.2.2. Chế tạo kháng thể IgY kháng BSA và kháng thể IgY kháng các độc tố ruột tịt cầu

Gà được gây miễn dịch để sản xuất kháng thể đa dòng IgY kháng BSA và kháng thể đa dòng IgY kháng các độc tố ruột tịt cầu SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE theo quy trình sản xuất kháng thể IgY của Agro-Bio 2011 [7]: Kháng nguyên BSA và kháng nguyên là 5 loại độc tố ruột tịt cầu (SEA+ SEB+ SEC₁+ SED+ SEE), gà Leghorn trắng mua từ Công ty cổ phần Giống gia cầm Ba Vì. Sau khi đẻ trứng được hai tuần, gà được tiêm 2 tuần một lần với 1mg kháng nguyên là BSA hoặc 100ng kháng nguyên 5 loại độc tố ruột tịt cầu (SEA+ SEB+ SEC₁+ SED+ SEE), gồm 20ng mỗi loại độc tố, bổ sung tá dược Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) trong lần tiêm đầu tiên và tá dược Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) trong những lần tiêm nhắc lại. Kháng nguyên trộn lẫn với tá dược Freund theo tỷ lệ 1:1, thể tích tiêm vào gà là 1 ml và tiêm bắp ở hai vị trí bên trái và bên phải cơ ngực. Kháng nguyên là BSA tiêm nhắc lại 2 lần, kháng nguyên là độc tố ruột tịt cầu tiêm nhắc lại 1 lần. Trứng được thu thập sau 12 ngày từ lần tiêm thứ 2 vào gà.

2.2.3. Tinh sạch kháng thể IgY

IgY được tinh sạch từ lòng đỏ trứng theo phương pháp được PetrHokder phát triển năm 2013 [8]: lòng đỏ trứng được pha loãng với PBS, tỷ lệ 1:1, tiếp tục pha loãng trong nước đến tỷ lệ 1:7, chỉnh pH=5 với HCl 0,5M, làm đông ở -20°C, làm tan băng ở nhiệt độ phòng và lọc bằng giấy lọc. Tiếp theo, bổ sung NaCl vào dung dịch thu được sau lọc với nồng độ 8,8%, chỉnh pH=4 với HCl 0,5M và đảo trộn dung dịch trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, ly tâm 3700g trong 20 phút. Cuối cùng, loại bỏ dịch và hòa tan cặn thu được trong PBS.

Sau đó, kháng thể IgY tiếp tục được tinh sạch bằng sắc ký ái lực với cột "HiTrap IgY

Purification HP" (GE Healthcare) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

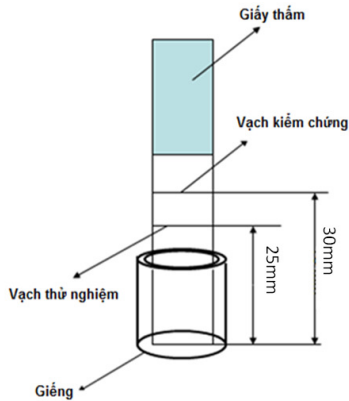
2.2.4. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch

Cố định IgY kháng các độc tố ruột tịt cầu SE (A+B+C₁+D+E) và IgY kháng BSA lên màng nitrocellulose

Màng nitrocellulose AE99 (Whatman) được cố định lên các lá vinyl Mylar AD back 79373 (Whatman). Kháng thể IgY kháng các độc tố ruột tịt cầu SE (A+B+C₁+D+E) và kháng thể IgY kháng BSA được phun lên trên màng nitrocellulose lần lượt ở vạch thử nghiệm và vạch kiểm chứng bằng thiết bị Linomat V (CAMAG, Thụy Sĩ). Lượng kháng thể vạch thử nghiệm được phun lên màng từ 0,2 µg; 0,6 µg đến 2 µg/que thử, vạch kiểm chứng 1,2 µg/que thử. Vị trí cố định của vạch thử nghiệm và vạch kiểm chứng lần lượt là 25 mm và 30 mm kể từ đầu que thử. Sau đó, màng được ủ ở 37°C qua đêm để làm khô. Sau khi gắn thêm giấy thấm, màng được cắt thành từng que thử có bề rộng là 4 mm bằng máy cắt Cutter 4000 (BioDot, Anh).

Chuẩn bị cộg hợp phát hiện SEC₁-nanocarbon

Kháng nguyên tinh sạch SEC₁ ở dạng dung hợp được gắn với hạt nanocarbon ở trạng thái huyền phù theo phương pháp mô tả bởi Koets [9] như sau: 50 µg SEC₁ chứa trong thể tích 500 µl dung dịch đệm borat (5 mM; pH 8,8) được thêm vào 1 mg hạt nanocarbon ở dạng dung dịch huyền phù carbon (Maia) chứa trong đệm borat (5 mM; pH 8,8). Tiếp đó, dung dịch này được lắc đều trong suốt 3 giờ. Sau đó thêm 500 µl BSA (3mg/ml) vào ống và tiếp tục trộn trong 30 phút. Hỗn hợp được rửa bằng cách ly tâm 16000g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, thêm vào 500 µl dung dịch đệm bảo quản (đệm borat 100 mM; pH 8,8, 1% BSA; 0,02% NaN₃). Bước rửa được lặp lại 3 lần. Phức hợp phát hiện kháng nguyên - nano carbon được chứa trong 500 µl dung dịch đệm bảo quản, để trong bóng tối, ở 4°C.



Hình 1. Sơ đồ que thử phát hiện nhanh các độc tố ruột tụ cầu.

Kháng nguyên cộng hợp và mẫu được trộn vào trong giếng và que thử được cắm vào giếng. Nếu có độc tố ruột tụ cầu SEA, SEB, SEC₁, SED hoặc SEE thì chỉ xuất hiện một vạch kiểm chứng còn nếu mẫu âm tính thì xuất hiện cả hai vạch trên que thử.

Phân tích mẫu bằng que thử

Mỗi mẫu phân tích có SEA, SEB, SEC₁, SED, SEE với nồng độ khác nhau được pha trong 100 μ l dung dịch đệm chạy (100 mM borat, pH 8,8; 0,5% Casein; 0,1% Tween 20) và được đưa vào giếng. Tiếp đó, cắm que thử vào giếng và ủ trong 15 phút. Sau đó, bổ sung 2 μ l kháng nguyên- nanocarbon. Quan sát kết quả sau 30 phút. Kết quả được coi là dương tính nếu chỉ xuất hiện vạch kiểm chứng. Ngược lại, kết

quả được coi là âm tính nếu xuất hiện tín hiệu tại cả vạch thử nghiệm và vạch kiểm chứng.

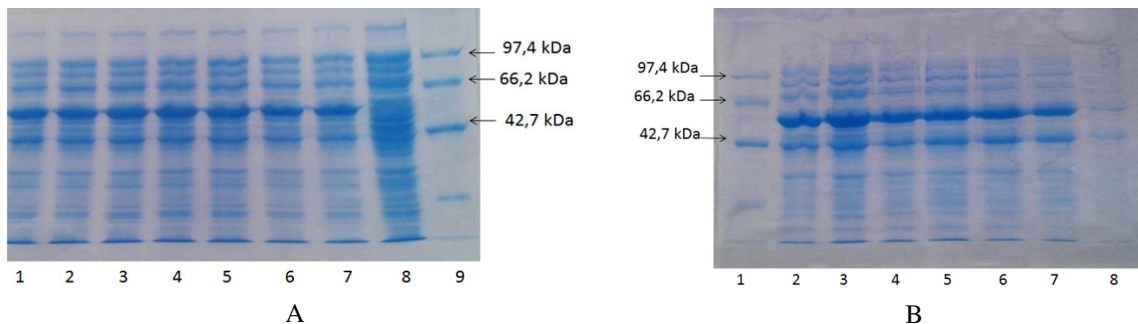
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện SEC₁ trong tế bào *E.coli* BL21

Để thu được lượng SEC₁ cao nhất, chúng tôi tiến hành thử biểu hiện SEC₁ ở các điều kiện nồng độ chất cảm ứng IPTG, nhiệt độ và thời gian cảm ứng khác nhau.

Tối ưu nồng độ chất cảm ứng IPTG: Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng tổng hợp protein SEC₁ tái tổ hợp ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau từ 0,05 đến 1mM (0,05 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,7 mM; 0,9 mM; 1mM), nuôi lactic ở 30°C và thu mẫu sau 5 giờ. Kết quả cho thấy nồng độ IPTG tối ưu cho cảm ứng là 0,5 mM (Hình 2A).

Tối ưu nhiệt độ cảm ứng và thời gian cảm ứng: Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng tổng hợp của protein SEC₁ tái tổ hợp trong các điều kiện nhiệt độ cảm ứng (30°C và 37°C) và thời gian cảm ứng (2 giờ, 5 giờ và 8 giờ) với nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,3 mM. Kết quả tối ưu hóa được nhiệt độ cảm ứng là 30°C và thời gian cảm ứng tối ưu là 8 giờ (Hình 2B).



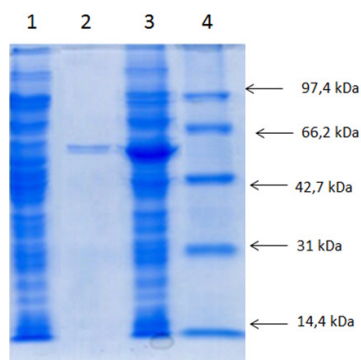
Hình 2. Điện di đồ protein SEC₁ biểu hiện ở các điều kiện cảm ứng

A. Điện di đồ protein SEC₁ biểu hiện ở các nồng độ chất cảm ứng từ 0 đến 1mM IPTG
Giếng 1-8: nồng độ IPTG lần lượt là 1mM; 0,9 mM; 0,7mM; 0,5mM; 0,3mM; 0,1 mM; 0,05mM; 0mM;
Giếng 9: Thang protein chuẩn. B. Điện di đồ protein SEC₁ biểu hiện ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian với nồng độ 0,5mM IPTG. Giếng 1: Thang protein chuẩn, giếng 2-8: điều kiện nhiệt độ và thời gian lần lượt là: 8h, 37°C; 8h30°C; 5h,37°C; 5h,30°C; 2h, 37°C; 2h,30°C; 0h.

Kết luận, điều kiện tối ưu để cảm ứng biểu hiện protein SEC₁ trong chủng biểu hiện *E.coli* BL21 là ở nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,5mM, nhiệt độ 30°C sau 8 giờ cảm ứng.

3.2. Tinh sạch protein tái tổ hợp SEC1

Nhằm mục đích tạo ra được một lượng lớn SEC1 ở dạng tinh sạch, chúng tôi tiến hành nuôi tế bào *E. coli* ở điều kiện tối ưu (30°C, 0,5 mM IPTG, 8 giờ). Theo thiết kế vector biểu hiện pGS-21a-sec₁, protein SEC₁ được tạo ra ở dạng dung hợp với đuôi 6 His-GST (6 Histidin-glutathione-S-transferase) ở đầu N. Đây là một đặc điểm thuận lợi cho việc tinh sạch độc tố ruột tụ cầu SEC1 tái tổ hợp bằng phương pháp sắc ký ái lực với đuôi His, sử dụng Kit His Mag SepharoTMNi. Để kiểm tra độ tinh sạch của protein SEC1 tái tổ hợp, dịch chiết protein thô và dịch protein sau tinh sạch được điện di biến tính bằng kỹ thuật SDS-PAGE. Kết quả điện di (Hình 3) chỉ ra rằng dịch protein tinh sạch cho một băng duy nhất có kích thước nằm trong khoảng 50-60 kDa, phù hợp với kích thước lý thuyết của protein dung hợp là khoảng 53kDa (SEA có khối lượng 27kDa, 2 His-GST có khối lượng 26kDa). Như vậy, chúng tôi đã thu được protein SEC1 tái tổ hợp tinh sạch.

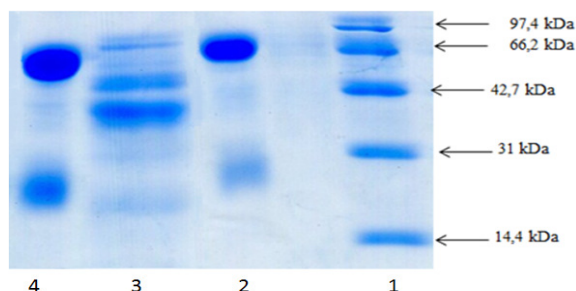


Hình 3. Điện di đồ protein SEC₁ tái tổ hợp.

Giếng 1: dịch chiết thô protein của chủng *E. coli* BL21 chưa được biến nạp; Giếng 2: dịch protein sau tinh sạch; Giếng 3: dịch chiết thô protein của chủng *E. coli* BL21 được biến nạp với plasmid pGS-21a-sec₁; Giếng 4: thang chuẩn protein.

3.3. Tinh sạch kháng thể IgY

Để chế tạo ra kháng thể IgY làm nguyên liệu cho que thử sắc ký miễn dịch chúng tôi tách chiết và tinh sạch kháng thể IgY kháng BSA và kháng thể IgY kháng các độc tố ruột tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED, SEE) từ những quả trứng được thu thập của các con gà đã được gây miễn dịch sau 2 lần tiêm. Kháng thể IgY thu được sau khi tinh sạch bằng phương pháp do PetrHokder tối ưu hóa năm 2013 (giếng 1, Hình 4) tiếp tục được tinh sạch bằng sắc ký ái lực với cột “HiTrap IgY Purification HP” (GE Healthcare), kết quả là thu được kháng thể IgY có độ tinh sạch cao hơn (giếng 4, Hình 4) để ứng dụng trong xét nghiệm chẩn đoán miễn dịch, phun lên vạch kiểm chứng và vạch thử nghiệm của que thử phát hiện các độc tố ruột tụ cầu.



Hình 4. Điện di đồ các giai đoạn tinh sạch kháng thể IgY qua cột sắc ký.

Giếng 1: thang protein chuẩn; Giếng 2: IgY sau tinh sạch bằng phương pháp pha loãng nước;

Giếng 3: Dịch rửa cột sau khi cho mẫu vào;

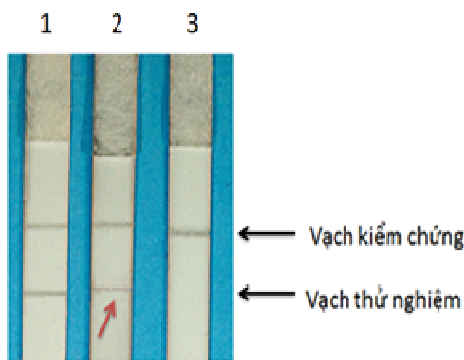
Giếng 4: IgY thu được sau tinh sạch qua cột sắc ký.

3.4. Ứng dụng kháng thể IgY và độc tố ruột tụ cầu SEC₁ tái tổ hợp để phát triển hệ thống sắc ký miễn dịch

Tối ưu lượng kháng thể cần cố định lên vạch thử nghiệm

Với kỹ thuật sắc ký miễn dịch cạnh tranh để tăng độ nhạy của phép phân tích thì lượng

kháng thể cần cố định lên màng phải vừa đủ, đảm bảo mẫu âm tính xuất hiện vạch thử nghiệm nhưng không được quá dư. Do vậy, kháng thể IgY kháng 5 loại độc tố ruột tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED, SEE) sau khi tinh sạch được khảo sát cố định lên màng với liều lượng khác nhau: 0,2 µg; 0,6 µg và 2 µg /que thử. Tiếp đó, sử dụng các que thử này để phân tích mẫu âm tính với liều lượng kháng thể cộng hợp là 2 µl/100 µl đệm chạy. Kết quả phân tích (Hình 5) chỉ ra rằng nồng độ kháng thể thấp nhất để vạch thử nghiệm xuất hiện rõ là 0,6 µg/que thử, ở nồng độ 0,2 µg vẫn thấy vạch thử nghiệm nhưng bị mờ khi nhìn bằng mắt thường. Trong các thí nghiệm tiếp theo, các que thử với lượng kháng thể cố định là 0,6 µg /que thử đã được sử dụng.



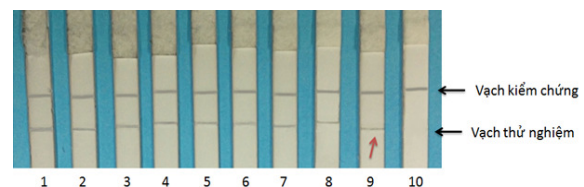
Hình 5. Lựa chọn lượng kháng thể cố định lên vạch thử nghiệm.

1. Nồng độ kháng thể là 2 µg/que thử
2. Nồng độ kháng thể là 0,6 µg /que thử
3. Nồng độ kháng thể là 0,2 µg /que thử

Xác định lượng kháng thể cộng hợp cần sử dụng

Vì sử dụng phương pháp cạnh tranh để phát hiện các độc tố ruột tụ cầu nên lượng kháng nguyên cộng hợp cần dùng phải có liều lượng ít nhất nhưng vẫn phải đảm bảo mẫu âm tính phải xuất hiện vạch. Để xác định được lượng kháng thể cộng hợp dùng cho mỗi phản ứng, chúng tôi tiến hành sử dụng 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 và 10 µl kháng nguyên cộng hợp cho mẫu âm tính.

Các kết quả (Hình 6) chỉ ra rằng lượng kháng nguyên cộng hợp nhỏ nhất vẫn cho các tín hiệu vạch khá rõ ràng là 2µl, ở nồng độ 1 µl vẫn thấy vạch thử nghiệm nhưng mờ, khó phát hiện bằng mắt thường. Do vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi sử dụng 2µl kháng nguyên cộng hợp cho một que thử.



Hình 6. Ảnh hưởng của lượng kháng nguyên cộng hợp đến cường độ tín hiệu vạch thử nghiệm.

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 và 10: Lượng kháng nguyên cộng hợp sử dụng cho 1 phản ứng là 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 và 1 µl.

Xác định ngưỡng phát hiện của que thử đối với độc tố ruột tụ cầu tinh khiết

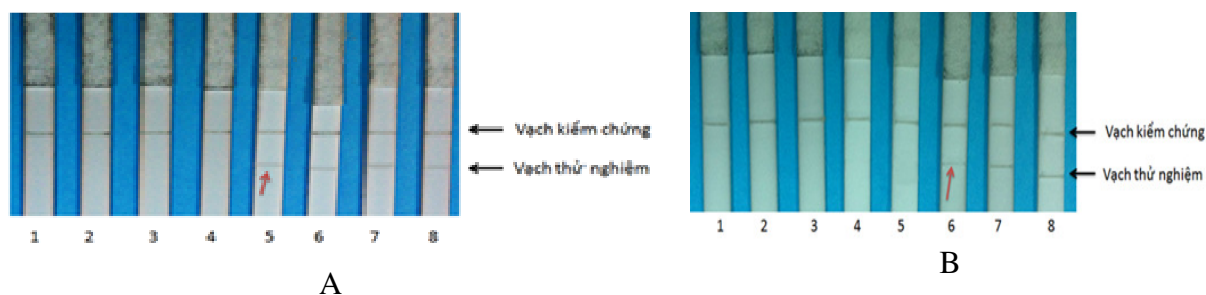
Để xác định ngưỡng phát hiện của que thử với các độc tố ruột SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE, chúng tôi đã chuẩn bị các mẫu độc tố ruột tụ cầu SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE tinh khiết với nồng độ từ 1 đến 1000 ng/ml (1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000 ng/ml) cho vào đệm chạy. Kết quả phân tích que thử trong đệm chạy cho thấy:

- Với độc tố ruột SEA các nồng độ (30 - 1000 ng/ml) là dương tính, không xuất hiện vạch thử nghiệm, trong khi các nồng độ (1-10 ng/ml) vẫn còn thấy xuất hiện tín hiệu ở vạch thử nghiệm nhưng mờ hơn so với mẫu kiểm chứng âm tính (Hình 7A). Kết quả phân tích các độc tố ruột tụ cầu SEB và SED cho thấy ngưỡng phát hiện của que thử tương tự như với độc tố SEA. Như vậy, nồng độ thấp nhất mà que thử phát hiện dương tính với các độc tố ruột tụ cầu SEA, SEB, SED là 30ng/ml.

- Trong khi đó, với các độc tố SEC₁ các nồng độ (10-1000 ng/ml) cho kết quả dương

tính còn các nồng độ thấp hơn (1-3 ng/ml) có xuất hiện vạch thử nghiệm mặc dù vạch này mờ hơn ở mẫu kiểm chứng âm tính (Hình 7B). Nồng độ độc tố thấp nhất mà que thử nhận ra độc tố SEC₁ (que số 5, Hình 7B) là 10ng/ml.

Kết quả phân tích với độc tố ruột tụ cầu SEE tương tự như với độc tố ruột SEC1. Vậy nồng độ thấp nhất mà que thử phát hiện dương tính với các độc tố ruột tụ cầu SEC1 và SEE là 10ng/ml.



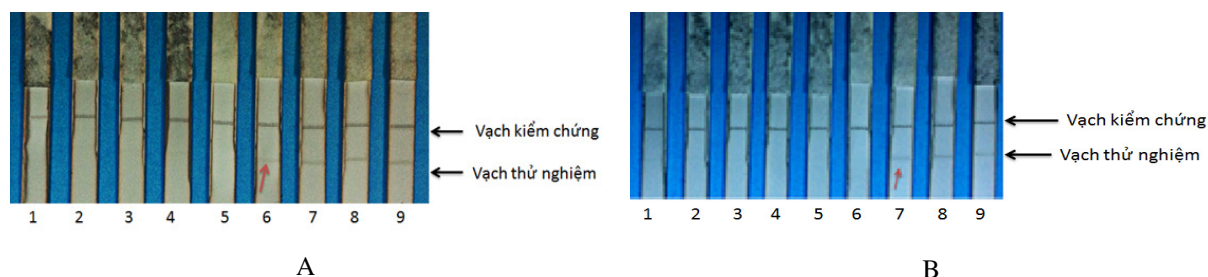
Hình 7. Thử độ nhạy của que thử với độc tố ruột tụ cầu.

A. Thử độ nhạy của que thử với SEA; B. Thử độ nhạy của que thử với SEC1
(1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8: Mẫu chứa 1000; 300; 100; 30; 10; 3; 1 ng/ml và mẫu âm tính không chứa độc tố).

Xác định ngưỡng phát hiện của que thử đối với độc tố ruột tụ cầu trong sữa

Khi sử dụng que thử phân tích mẫu sữa, các mẫu sữa được sử dụng trực tiếp, không qua giai đoạn xử lý nào, chỉ cần pha loãng trước khi phân tích với tỷ lệ 1 sữa: 2 đệm chảy (100 mM borat, pH 8,8; 0,5% Casein; 0,1% Tween 20) để tạo dòng chảy tốt cho mẫu trên màng nitrocellulose của que thử [9]. Mẫu sữa đã pha loãng được bổ sung các độc tố ruột tụ cầu từ 3 đến 3000 ng/ml để xác định giới hạn phát hiện các độc tố ruột SEA, SEB, SEC₁, SED và SEE

của que thử trong mẫu sữa. Kết quả phân tích que thử trong mẫu sữa cho thấy: Nồng độ độc tố SEA thấp nhất mà que thử dương tính (que 5, hình 8A) là 30ng. Nồng độ độc tố SEC1 thấp nhất mà que thử dương tính là 9 ng (que 6, hình 8B). Kết quả phân tích với độc tố ruột tụ cầu SEB và SED cũng cho kết quả tương tự với độc tố SEA; SEE tương tự như với độc tố ruột SEC1. Như vậy nồng độ thấp nhất mà que thử phát hiện dương tính trong mẫu sữa với các độc tố ruột tụ cầu SEA, SEB, SED là 30ng/ml, với hai độc tố SEC₁ và SEE là 9 ng/ml.



Hình 8. Thử độ nhạy của que thử với độc tố ruột tụ cầu trong sữa.

A. Thử độ nhạy của que thử với SEA trong sữa; B. Thử độ nhạy của que thử với SEC₁ trong sữa
(1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9: Mẫu chứa 3000; 900; 300; 90; 30; 9; 3 ng/ml; mẫu âm tính không chứa độc tố trong sữa và mẫu âm tính không chứa độc tố trong đệm).

Hiện nay các phương pháp ELISA để phát hiện các loại độc tố ruột tụ cầu đang được lưu hành trên thị trường có ngưỡng phát hiện khoảng 0,2 - 2 ng/ml [3]. Trong các nghiên cứu của Boyle và các cộng sự, que thử phát hiện SEB đã được tạo ra dựa trên phương pháp sắc ký miễn dịch kẹp đôi, nồng độ độc tố SEB thấp nhất phát hiện bằng mắt thường là 500 ng/ml, khi sử dụng máy quét cầm tay là từ 0,25 ng/ml [10]. Trong nghiên cứu của Keiko Yamada sử dụng kháng thể IgY gà và ứng dụng kỹ thuật sắc ký kẹp đôi tạo que thử phát hiện độc tố ruột tụ cầu SEA với nồng độ thấp 0,2 ng/ml trên sản phẩm sữa [3]. Que thử được tạo ra trong nghiên cứu này sử dụng kháng thể IgY gà, ứng dụng kỹ thuật sắc ký miễn dịch cạnh tranh, phát hiện đồng thời được 5 loại độc tố ruột tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED, SEE) trong sữa với nồng độ độc tố thấp nhất phát hiện ở các độc tố ruột tụ cầu SEA, SEB, SED là 30ng/ml, ở hai độc tố SEC₁ và SEE là 9 ng/ml.

Kết luận

Que thử được tạo ra trong nghiên cứu này phát hiện đồng thời được 5 loại độc tố tụ cầu (SEA, SEB, SEC₁, SED, SEE) trong sữa với ngưỡng phát hiện khá thấp, gần tương đương với ELISA đối với SEC₁ và SEE. Hơn nữa, khi so với các sinh phẩm ELISA, hệ thống sắc ký miễn dịch có nhiều ưu điểm như đơn giản, thời gian phân tích ngắn, phù hợp cho các phân tích trên hiện trường.

Tài liệu tham khảo

[1] Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2, 1751.

- [2] Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* 110, 519.
- [3] Wanchun Jin, Keiko Yamada, Mai Ikami (2013), "Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products", *Journal of Microbiological Methods* 92, pp 323.
- [4] Hennekinne, J.A., Guillier, F., Perelle, S., De Buyser, M.L., Dragacci, S., Krysz, S., Lombard, B., 2007. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261.
- [5] Richman, D.D., Cleveland, P.H., Oxman, M.N., Johnson, K.M., 1982. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* 128, 2300.
- [6] Leammli. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227: 680.
- [7] Agro-Bio (2001), Protocol for the production of chicken polyclonal antibodies specific IgY, Version 2011/01.
- [8] Petr Hodek, Pavel Trefil, Jiri Simunek, Jiri Hudecek, Marie Stiborova (2013), Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations, *Int.J. Electrochem. Sci.*, 8(2013) 113.
- [9] Koets M., Sander I., Bogdanovic J., Doekes G., van Amerongen A.(2006), A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *J Environ Monit* 8 (2006) 942-6.
- [10] Boyle, T., Njoroge, J.M., Jones Jr., R.L., Principato, M., 2010. Detection of staphylococcal enterotoxin B in milk and milk products using immunodiagnostic lateral flow devices. *J. AOAC Int.* 93, 569-575.

Development of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Milk

Trần Thị Sao Mai¹, Nguyễn Thị Khánh Trâm², Lê Quang Hòa³

¹*Hai Duong Medical Technical University*

²*National Institute of Nutrition*

³*School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology*

Abstract: Staphylococcal enterotoxins (SEs), produced by *Staphylococcus aureus*, are major cause of staphylococcal food poisoning. The aim of this study is to develop a lateral flow immunoassay (LFIA) for the rapid detection of SEs (SEA, SEB, SEC1, SED, SEE) in pasteurized milk, based on competitive lateral flow immunoassay. In this study, prepared antigen recombinant SEC1 was conjugated to colloidal carbon particles, anti Staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC1, SED, SEE) chicken IgY antibody was sprayed on nitrocellulose to form the test line, and anti BSA (Bovine serum albumin) chicken IgY antibody was spray on nitrocellulose to form the control line of LFIA. The fusion protein SEC1-His-GST (for Histidin-glutathione-S-transferase) was effectively expressed in *Escherichia coli* BL21 under optimized conditions (induction by 0,5 mM IPTG for 8 h at 30°C). After the optimization of amounts of anti Staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC1, SED, SEE) chicken IgY antibody is immobilized on the test line of strips and conjugate antigen needed for a test, the detection limit of the developed lateral flow immunoassay was estimated at 30 ng/ml in milk for each SEs (SEA, SEB, SED) and was about 10ng/ml for each SEs (SEC1, SEE).

Keywords: Staphylococcal enterotoxin, lateral flow immunoassay, immune-chromatography, milk, on-site detection.