



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001954

(51)⁷ **G01N 33/53**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00210

(22) 09.06.2016

(45) 25.02.2019 371

(43) 25.08.2016 341

(73) **VIỆN HẢI DƯƠNG HỌC (VN)**

01 đường Cầu Đá, phường Vĩnh Nguyên, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa

(72) **Đào Việt Hà (VN), Phạm Xuân Kỳ (VN), Lê Hồ Khánh Hỷ (VN), Nguyễn Thu Hồng (VN), Đặng Quốc Minh (VN), Phan Bảo Vy (VN)**

(74) **Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Gia Việt (GIAVIET CO., LTD.)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KIT ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỘC TỐ GÂY MẤT TRÍ NHỚ
TẠM THỜI KHÔNG HỒI PHỤC Ở NGƯỜI VÀ KIT ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG
PHƯƠNG PHÁP NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Ammensic Shellfish Poisoning: ASP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) thu độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata*; b) tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp; c) thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic; d) tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn; và e) tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến kit được sản xuất theo phương pháp nêu trên để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh và công nghệ miễn dịch ứng dụng trong phân tích hóa sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP) và kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người được sản xuất bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay, ngộ độc thực phẩm do độc tố vi tảo đã trở nên phổ biến, đe dọa tính mạng con người, hệ sinh thái biển và nền kinh tế do sự bùng phát của một số loài vi tảo độc hại có khả năng sản sinh độc tố tự nhiên có hoạt tính gây độc đối với sinh vật bậc cao. Khi các sinh vật bị nhiễm độc tố vi tảo này được con người sử dụng làm thức ăn, chúng sẽ gây nên hiện tượng ngộ độc, thậm chí dẫn đến tử vong. Tùy vào bản chất hóa học và đặc tính hóa lý, mỗi loại độc tố có những cơ chế tác động và hiệu ứng sinh học đặc trưng, có thể gây tổn hại hệ thần kinh hoặc hệ tiêu hóa ở người và động vật bậc cao khác.

Đối với độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic shellfish poisoning toxin - ASP) có bản chất hóa học là axit domoic (DA) được sản sinh bởi các loài vi tảo độc, điển hình là từ tảo đỏ *Chondria armata*. Đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến phương pháp xác định độc tố này trong các loài sinh vật biển, đặc biệt là trong các loài nhuyễn thể. Phương pháp phổ biến sử dụng cho mục đích giám sát độc tố này là thử nghiệm sinh học trên chuột (Mouse Bioassay - MBA) hoặc phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC). Tuy nhiên, MBA có độ nhạy kém, sai số lớn và phụ thuộc nhiều vào tình trạng sức khỏe của động vật thử nghiệm. Phương pháp HPLC mất thời gian và cần trang thiết bị đắt tiền, không phải phòng thí nghiệm nào cũng có khả năng trang bị đủ các thiết bị cần thiết để thực hiện.

Theo các tài liệu đã công bố, hiện có hai phương pháp để điều chế phức hợp kháng nguyên từ kháng nguyên không hoàn chỉnh là axit domoic (DA). Phương pháp thứ nhất là tạo liên kết giữa gốc amin bậc một ($-NH_2$) của protein tải và gốc carboxyl ($-COOH$) của DA, gọi là liên kết cacbon của phân tử axit domoic (C-DA) trong điều kiện có mặt của natri bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinat. Ở phương pháp này, do DA có ba gốc carboxyl ($-COOH$) có thể bắt cặp hoàn toàn ngẫu nhiên với phân tử protein tải nên thường tạo ra lượng kháng thể không cao và thiếu tính đặc hiệu. Phương pháp thứ hai tạo liên kết giữa gốc amin ($-NH_2$) của DA với gốc carboxyl ($-COOH$) của protein tải (gọi là liên kết nito của phân tử axit domoic, N-DA). Tuy nhiên, gốc amin bậc hai ($=NH$) của DA không thể kết hợp trực tiếp với gốc $-COOH$ của protein tải, nên đòi hỏi phải chuyển đổi nhóm amin bậc hai này ($=NH$) sang dạng amin bậc một ($-NH_2$) để có thể kết hợp với $-COOH$ của protein tải trong điều kiện có mặt của axetal- 2-methoxy-7-(hydroxymethyl)oxepan. Phương pháp này đã khắc phục được hạn chế của cách sử dụng liên kết C-DA, do sử dụng nhóm $=NH$ duy nhất của DA, nên kháng thể thu nhận có sản lượng cao hơn với độ đặc hiệu tốt hơn, nhưng phương pháp này lại quá phức tạp, đòi hỏi thời gian thực hiện lâu và tốn kém và hiệu suất của phản ứng điều chế phức hợp kháng nguyên lại thấp.

Đã có nhiều giải pháp nhằm phát hiện nhanh độc tố này trên cơ sở kit ELISA. Tài liệu CN 101949923 A đã đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người trên cơ sở kỹ thuật ELISA, phương pháp này sử dụng kháng thể kháng độc tố axit domoic từ tảo đỏ. Tuy nhiên, phương pháp theo giải pháp khó thu được kháng thể do việc tạo kháng thể trực tiếp từ axit domoic không đặc hiệu và có hiệu suất kém. Tài liệu CN 1979171 A đã đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người trên cơ sở kỹ thuật ELISA, trong đó phương pháp này sử dụng BSA-DA gây miễn dịch cho thỏ để thu nhận kháng thể kháng độc tố DA. Tuy nhiên, các tài liệu này sử dụng các kỹ thuật gây miễn dịch trực tiếp từ độc tố DA hoặc dạng BSA-DA nên có tính đặc hiệu kém và hiệu suất thu hồi kháng thể thấp. Tài liệu CN 102539746 A đã đề cập đến kit để phát hiện nhanh độc tố axit domoic trên cơ sở các tấm vi chuẩn độ, trong đó sử dụng thể tiếp hợp kháng nguyên đánh dấu enzym tiếp hợp với peroxidaza từ cây cải ngựa, tuy nhiên, kháng nguyên đánh dấu này có kết quả phát hiện không rõ ràng nên ngưỡng phát hiện thấp.

Do đó, cần phương pháp sản xuất kit trên cơ sở kỹ thuật ELISA để phát hiện nhanh độc tố ASP nhằm khắc phục được các nhược điểm liên quan đến hiệu suất cũng như tính đặc hiệu của kháng thể thu được.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm khắc phục các vấn đề nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đã đề xuất phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không khôi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP) và kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không khôi phục ở người thu được từ phương pháp này.

Bằng cách cải tiến kháng nguyên cộng hợp giữa nhóm chức N-hydroxysuccinimit (NHS) este với nhóm amin $=NH$ của DA và nhóm amin $-NH_2$ của protein tải, thông qua cầu nối DSS (disuccinimidyl suberat). Bằng cách sử dụng trực tiếp hai nhóm N-hydroxysuccinimit (NHS) este của DSS để làm cầu nối giữa DA và protein tải tạo ra kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-protein. Các tác giả đã phát hiện ra rằng hiệu suất tạo kháng thể và tính đặc hiệu của kháng thể thu được này được cải thiện rõ rệt. Theo đó, kit được sản xuất bằng kháng thể thu được từ kháng nguyên cộng hợp có độ nhạy cao hơn và đặc hiệu hơn. Do đó, các tác giả đã tạo ra được giải pháp.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* bằng cách chiết tảo đỏ bằng axit axetic 0,05M và tinh sạch bằng sắc ký cột, sau khi đông khô thu được độc tố axit domoic (DA) tinh sạch;

b) tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp bằng cách hòa độc tố axit domoic (DA) thu được từ bước a) trong nước cất và cho cộng hợp với disuccinimidyl suberat (DSS) trong CH_2Cl_2 , sau khi loại bỏ dung môi, thu được phức hợp DA-DSS dạng bột, tiếp đó cho phức hợp này cộng hợp với protein albumin huyết thanh bò (BSA) trong môi trường đệm PBS thu được phức hợp kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA;

c) thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic bằng cách ly tâm máu thu được từ thỏ đã được gây miễn dịch bằng phức hợp kháng nguyên cộng hợp N-DA-DSS-BSA thu được từ bước b) để thu huyết thanh, sau đó chuyển phần huyết thanh này lên cột sắc ký sepharosa 4B với pha rắn là độc tố axit domoic (DA) giải hấp bằng dung dịch Gly-Trys, độ pH=6,8 thu phân đoạn dương tính với chỉ thị là IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG), sau khi đông khô, thu được kháng thể kháng độc tố axit domoic tinh sạch;

d) tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn bằng cách bổ sung 160 nM axit domoic thu được từ bước a) vào bản nhựa bao gồm các giếng có diện tích 1cm^2 và đậy kín bằng màng mỏng, sau đó ủ bản nhựa ở 37°C trong 1 giờ, sau khi thu hồi dung dịch trong các giếng và rửa bằng dung dịch bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST) và bổ sung 300 μL dung dịch gelatin 3% và ủ tiếp trong 1 giờ ở 37°C và rửa lại bằng dung dịch PBST thu được bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn làm bề mặt rắn cho phản ứng; và

e) tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người bằng cách đóng gói các thành phần bao gồm:

- độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu được từ bước a) với nồng độ 160nM;
- kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c);
- bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn thu được từ bước d);
- dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;
- chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);
- dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);
- hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và
- dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H_2SO_4 .

Theo một phương án ưu tiên, trong đó huyết thanh thỏ được pha loãng 15 lần bằng dung dịch đệm PBS trước khi tiến hành sắc ký để thu kháng thể kháng độc tố axit domoic.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c) có nồng độ là 320nM.

Trong đó, khác biệt ở chỗ phương pháp theo giải pháp hữu ích tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp bằng cách liên kết N-DA giữa 02 gốc amin là amin thứ cấp =NH của phân tử axit domoic và amin sơ cấp $-NH_2$ của protein albumin huyết thanh bò thông qua cầu nối hoá học DSS (disuccinimidyl suberat) để tạo sản phẩm kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA trước khi gây miễn dịch để thu được kháng thể kháng độc tố axit domoic.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người được sản xuất theo phương pháp theo giải pháp, trong đó kit này bao gồm:

- độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu được từ bước a) với nồng độ 160nM;
- kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c);
- bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn thu được từ bước d);
- dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;
- chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);
- dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);
- hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và
- dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H_2SO_4 .

Theo một phương án ưu tiên, kit theo giải pháp hữu ích còn bao gồm hướng dẫn sử dụng để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời có trong sinh vật biển hoặc mẫu có nguồn gốc từ sinh vật biển.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Các thành phần theo giải pháp hữu ích, trừ khi được đề cập cụ thể hoặc có chỉ dẫn khác là các thành phần có thể thu được bởi các nhà cung cấp hoặc đã được mô tả cụ thể và có thể thu được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các thành phần như dung dịch đệm PBS, dung dịch rửa PBST (1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4), chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG) là sản phẩm thương mại có thể mua được trên thị trường. Ngoài ra, các hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD) hay dung dịch 2N H₂SO₄ là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Giải pháp đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP) và kit được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) thu độc tố axit domoic từ tảo đỏ *Chondria armata*; b) tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp; c) thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic; d) tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn; và e) tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người.

Trong bước thu độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata*. Tảo đỏ là loài tảo *Chondria armata* phân bố ở đảo Ryukyu vùng phía tây Nhật Bản được chiết bằng axit axetic 0,05M. Axit domoic được tinh sạch bằng sắc ký cột, ví dụ cột Bio-Gel P2, sau khi đông khô thu được độc tố axit domoic (DA) tinh sạch để sử dụng cho các công đoạn tiếp theo.

Trong bước tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp, tiến hành hòa độc tố axit domoic (DA) thu được ở trên với nước cất để thu dạng dịch. Tiếp đó, cho axit domoic cộng hợp với disuccinimidyl suberat (DSS) bằng cách hòa disuccinimidyl suberat trong CH₂Cl₂, tiếp đó bổ sung dung dịch axit domoic để phản ứng cộng hợp xảy ra. Sau khi loại bỏ dung môi, thu được phức hợp DA-DSS dạng bột. Tiếp đó cho phức hợp này cộng hợp với protein albumin huyết thanh bò (BSA) trong môi trường đệm PBS thu được phức hợp kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA.

Bằng cách cải tiến kháng nguyên cộng hợp giữa nhóm chức N-hydroxysuccinimit (NHS) este với nhóm amin $=NH$ của DA và nhóm amin $-NH_2$ của protein albumin huyết thanh bò (BSA), thông qua cầu nối DSS (disuccinimidyl suberat). Việc sử dụng trực tiếp hai nhóm N-hydroxysuccinimit (NHS) este của DSS để làm cầu nối giữa DA và protein albumin huyết thanh bò tạo ra kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA nhằm làm tăng hiệu quả và tính đặc hiệu của kháng thể thu được.

Kháng thể kháng độc tố axit domoic được tạo ra từ động vật bằng cách gây miễn dịch bằng kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA thu được theo giải pháp. Theo một phương án, động vật được sử dụng để sản sinh kháng thể có thể là thỏ, theo phương án ưu tiên, thỏ được sử dụng là thỏ trắng New Zealand. Sau khi thỏ được gây miễn dịch bằng phương pháp chuẩn, thu mẫu máu để tách kháng thể.

Trong bước thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic, mẫu máu thu được từ thỏ được gây miễn dịch bằng phức hợp kháng nguyên cộng hợp N-DA-DSS-BSA được sử dụng để tách kháng thể. Theo đó, mẫu máu được ly tâm để thu huyết thanh, sau đó chuyển phần huyết thanh này lên cột sắc ký sepharoza 4B với pha rắn là độc tố axit domoic (DA) làm chất hấp phụ đặc hiệu. Tiếp đó, giải hấp bằng dung dịch Gly-Trys, độ pH=6,8 thu phân đoạn dương tính với chỉ thị là IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG). Sau khi đông khô, thu được kháng thể kháng độc tố axit domoic tinh sạch.

Theo một phương án ưu tiên, huyết thanh thỏ được pha loãng 15 lần bằng dung dịch đệm PBS trước khi tiến hành sắc ký để thu kháng thể kháng độc tố axit domoic.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được ở trên được chuẩn độ đến nồng độ là 320nM.

Trong bước tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn, bản nhựa được sử dụng là bản nhựa 96 giếng, mỗi giếng có diện tích 1 cm^2 . Các tác giả đã nghiên cứu và xác định được nồng độ kháng thể tối ưu có thể tích hợp cho mỗi diện tích là 160 nM axit domoic. Theo đó, mỗi giếng được bổ sung 160 nM axit domoic và đậy kín bằng màng mỏng. Bản nhựa được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Tiếp đó, thu hồi dung dịch trong các giếng và rửa bằng dung dịch bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST). Sau khi bổ sung 300 μL dung dịch gelatin 3%, ủ tiếp trong 1 giờ ở 37°C và rửa

lại bằng dung dịch PBST thu được bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn làm bề mặt rắn cho phản ứng để làm cơ sở cho phản ứng kháng nguyên-kháng thể trong xét nghiệm ELISA.

Trong bước tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người, các thành phần của kit được đóng gói bao gồm các thành phần: độc tố axit domoic, kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được theo giải pháp, bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn, dung dịch đệm PBS, chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng proxidaza của cây cải ngựa, hóa chất tạo phức màu, và dung dịch dừng phản ứng, trong đó:

- Độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu được theo giải pháp được chuẩn độ với nồng độ 160nM, độc tố này được sử dụng để làm đối chứng dương.

- Kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được theo giải pháp, kháng thể này được sử dụng để tạo phức kháng nguyên-kháng thể trong đối chứng dương.

- Bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn thu được theo giải pháp, trong đó mỗi giếng được tích hợp 160nM kháng nguyên.

- Dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4 để làm đệm môi trường phản ứng.

- Chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG) được sử dụng làm kháng thể thứ hai trong xét nghiệm ELISA nhằm tạo phức kháng nguyên-kháng thể.

- Dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST) dùng để rửa bản nhựa sau khi phản ứng ELISA xảy ra.

- Hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD) cùng với chỉ thị để tạo phức màu.

- Dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H₂SO₄.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người được sản xuất theo phương pháp theo giải pháp, trong đó kit này bao gồm:

- độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu với nồng độ 160nM;

- kháng thể kháng độc tố axit domoic cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA;

- bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn với 160nM axit domoic mỗi giếng;

- dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;

- chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);

- dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);

- hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và

- dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H₂SO₄.

Theo một phương án ưu tiên, kit theo giải pháp hữu ích còn bao gồm hướng dẫn sử dụng để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời có trong sinh vật biển hoặc mẫu có nguồn gốc từ sinh vật biển.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Sản xuất kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người

a) Thu nhận độc tố axit domoic

Lấy 1kg tảo đỏ *Chondria armata* cho vào 1 lít axit axetic 0,05M, sau khi ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút, thu được dịch trong chứa độc tố axit domoic (domoic acid: DA). Chuyển phần dịch trong này qua cột sắc ký lọc gel Bio-Gel P2 (200-400 mesh, Bio-Rad) và giải hấp phụ bằng 500 ml axit acetic 0,05M. Thu các phân đoạn 10 ml, kiểm tra sự có mặt của DA bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp đầu dò tia cực tím (UV-HPLC) (Kodama và Kotaki, 2005 có cải tiến), thu gom các phân đoạn chứa DA. Theo đó, phần dịch được đông khô thu được 100 mg DA.

b) Tạo phức kháng nguyên cộng hợp

Hòa 1 mg độc tố axit domoic (DA) thu được ở trên với 10 ml nước cất. Tiếp đó hòa disuccinimidyl suberat (DSS) trong CH₂Cl₂ nồng độ 10% và bổ sung với dung

dịch kháng nguyên cộng hợp thu được ở trên theo tỷ lệ 1:1. Sau khi loại bỏ dung môi, thu được phức hợp DA-DSS dạng bột. Tiếp đó, hòa phức hợp này với 40ml môi trường đệm PBS và cho phức hợp này cộng hợp với 20 mg protein albumin huyết thanh bò (BSA). Kết quả thu được dung dịch chứa phức hợp kháng nguyên cộng hợp.

c) Thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic

Phức hợp kháng nguyên cộng hợp thu được ở trên được chuẩn độ đến 50µg/ml. Tiếp đó tiêm 10 ml dung dịch chứa phức hợp kháng nguyên cộng hợp N-DA-DSS-BSA vào thỏ cái New Zealand khối lượng 1kg (tiêm bắp đùi) theo định kỳ hàng tuần trong vòng 06 tháng. Khi thỏ sản sinh kháng thể, thu 200 ml máu, ly tâm máu ở 3000 vòng/phút trong 20 phút để thu nhận 50 ml huyết thanh chứa kháng thể. Huyết thanh chứa kháng thể được cho chảy qua cột sắc ký ái lực Sepharosa 4B gắn pha rắn là DA, giải cột bằng 500 ml Gly-Tris pH 6,8; thu các phân đoạn 10 ml. Kiểm tra hoạt tính kháng thể trong các phân đoạn bằng Dot Blot sử dụng chỉ thị là kháng thể 2 đặc hiệu (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG) kháng thể đặc hiệu với chuỗi nặng của IgG của thỏ, đã gắn với enzym đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa. Đông khô các phân đoạn có hoạt tính thu kháng thể tinh sạch. Lượng kháng thể thu nhận được từ 50ml huyết thanh thỏ là 624 µg được pha trong 1ml dung dịch đệm PBS (ứng với nồng độ kháng thể 9,6µM), được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

d) Tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn

Bổ sung 160 nM axit domoic thu vào từng giếng của bản nhựa 96 giếng (Maxi Sorp), mỗi giếng có diện tích 1cm² và đậy kín bằng màng nilon mỏng. Tiếp đó, ủ bản nhựa ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi thu hồi dung dịch trong các giếng và rửa bằng dung dịch bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST), bổ sung 300µL dung dịch gelatin 3% và ủ tiếp trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi rửa lại bằng dung dịch PBST thu được bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn làm bề mặt rắn cho phản ứng.

e) Tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người

Tiến hành tạo kit bằng cách đóng gói các thành phần bao gồm:

- 200 ml độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu được từ bước a) được chuẩn đến nồng độ 160nM;
- 6 ml kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c);
- 01 bản bản nhựa 96 giếng tích hợp kháng nguyên pha rắn thu được từ bước d);
- 20 ml dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;
- 12 ml chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);
- 25 ml dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);
- 40 mg hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và
- 12 mL dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H₂SO₄.

Các thành phần nêu trên được đóng gói và bảo quản ở 4-10°C và được sử dụng để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người trong thời gian từ 2-4 tuần. Kit nêu trên được sử dụng để phân tích cho 26 lần thử nghiệm.

Ví dụ 2. Thử nghiệm phân tích độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người trong mẫu sinh vật biển

Các mẫu sinh vật biển được sử dụng để phân tích hàm lượng độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người được chọn là mẫu Hàu hương *Spondylus versicolor* thu tại đầm Nha Phu, tỉnh Khánh Hoà. Mẫu được thu ngoài thực địa và bảo quản lạnh để tiến hành phân tích.

Chiết rút độc tố ASP trong mẫu:

Tách vỏ 13 mẫu cá thể Hàu hương để thu mô mềm và xay nhuyễn từng mẫu độc lập bằng máy xay. Mỗi mẫu cân chính xác 5g mô mềm và bổ sung 10 mL nước cất, khuấy đều và đun sôi cách thủy trong 5 phút, định mức bằng nước cất đến thể tích cuối cùng là 10 mL (0.5g/1 mL), để nguội, ly tâm ở 10,000 v/p trong 15 phút thu dịch trong.

Phân tích độc tố ASP trong mẫu Hàu hương bằng kit theo giải pháp:

Dùng micropipet bơm 50 μL dịch chiết Hàu hương, pha loãng 1000 và 4000 lần với dung dịch của lọ số 1 bằng đệm PBS, tổng số mẫu phân tích là 26) và các dung dịch kháng nguyên chuẩn DA nồng độ 0,1; 1,0; 10; 100 nM (được chuẩn bị bằng cách pha loãng bằng dung dịch đệm theo tỉ lệ lần lượt là 1600; 160; 16 và 1,6 lần vào các giếng của bản nhựa ELISA (mỗi nồng độ lặp lại 3 lần) theo sơ đồ mô tả trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Sơ đồ mô tả thử nghiệm ASP-ELISA trên bản nhựa 96 giếng

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Đối chứng âm (PBS)			Mẫu số 3			Mẫu số 11			Mẫu số 19		
B	DA (0,1 nM)			Mẫu số 4			Mẫu số 12			Mẫu số 20		
C	DA (1nM)			Mẫu số 5			Mẫu số 13			Mẫu số 21		
D	DA (10nM)			Mẫu số 6			Mẫu số 14			Mẫu số 22		
E	DA (100nM)			Mẫu số 7			Mẫu số 15			Mẫu số 23		
F	Đối chứng dương (nước cất)			Mẫu số 8			Mẫu số 16			Mẫu số 24		
G	Mẫu số 1			Mẫu số 9			Mẫu số 17			Mẫu số 25		
H	Mẫu số 2			Mẫu số 10			Mẫu số 18			Mẫu số 26		

Bơm vào mỗi giếng 50 μL dung dịch huyết thanh thô chứa kháng thể kháng DA, phủ kín bản nhựa bằng màng nilon, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Rửa các giếng 3 lần với dung dịch rửa (1% PBST).

Bơm vào mỗi giếng 100 μL dung dịch chỉ thị IgG (HRP-labeled anti-goat/rabbit IgG) nồng độ 320 nM và gói kín bản nhựa, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Rửa các giếng 3 lần với dung dịch rửa bản nhựa (PBST 1%).

Bơm vào mỗi giếng 100 μL dung dịch OPD và ủ ở 37°C trong 15 phút.

Bơm vào mỗi giếng 100 μL dung dịch lọ dừng phản ứng (2N H_2SO_4).

Sau khi đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 490nm trên máy ELISA PLATE READER và tính số liệu theo mật độ quang bằng excel để xác định nồng độ độc tố axit domoic có trong mẫu thử nghiệm. Kết quả cho thấy kit theo giải pháp có ngưỡng phát hiện khoảng 10nM (tương ứng với 1,56 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). Điều này cho thấy rằng kháng

thể thu được theo giải pháp được cải thiện về tính đặc hiệu. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích độc tố trong mẫu Hàu hương theo giải pháp

STT mẫu	DF	OD1	OD2	OD3	OD tb	nM
1	4000	0,704	0,708	0,634	0,682	49,567
2	4000	0,906	1,009	0,972	0,962	19,130
3	4000	0,926	0,884	0,809	0,873	25,911
4	4000	0,556	0,605	0,497	0,553	76,904
5	4000	0,56	0,538	0,56	0,553	76,904
6	4000	0,757	0,653	0,626	0,678	50,131
7	4000	0,686	0,681	0,649	0,672	51,279
8	4000	0,57	0,5	0,485	0,518	86,415
9	4000	0,838	0,748	0,856	0,814	31,659
10	4000	1,064	1,119	1,136	1,106	11,731
11	4000	0,558	0,611	0,604	0,591	67,517
12	4000	0,409	0,472	0,42	0,433	115,203
13	4000	0,435	0,417	0,424	0,425	55,951

Quy cách làm việc với kit theo giải pháp hữu ích được tóm tắt trong Bảng 3 dưới đây:

Bảng 3. Quy cách làm việc với kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người tiêu biểu

Thao tác	Yêu cầu phải đạt
Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất để làm phản ứng	Dụng cụ và hóa chất đầy đủ
Bơm 50µl kháng nguyên, chứng âm, chứng dương vào giếng nhựa đã tích hợp kháng nguyên pha rắn (DA)	Lấy đúng khối lượng, thể tích
Ủ ở 37°C trong 1 giờ	Đúng thời gian
Rửa các giếng bằng dung dịch đệm PBST 1%	Rửa kỹ
Đổ ráo nước.	Các giếng phải khô
Bơm 100 µl kháng thể kháng DA vào mỗi giếng	Lấy đúng khối lượng/thể tích

Ủ ở 37°C trong 1 giờ	Đúng thời gian
Rửa các giếng bằng dung dịch đệm PBST 1%	Rửa kỹ
Để cho ráo nước	Các giếng phải khô
Bơm 100µl chất tạo màu (dung dịch OPD) vào mỗi giếng, ủ ở 37°C trong 10-15 phút	Lấy đúng khối lượng/thể tích
Bơm 50 µL H ₂ SO ₄ vào để ngưng phản ứng tạo màu	Lấy đúng khối lượng/thể tích. Nhỏ vào giếng theo thời gian chuẩn
Đọc kết quả bằng máy đọc ELISA tự động (490 nm) hoặc bằng mắt	Đọc trong thời gian theo quy định

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp sản xuất kit theo giải pháp cho phép tạo được kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người có tính đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể vượt trội, cho phép phân tích được mẫu độc tố axit domoic ở ngưỡng phát hiện 10nM. Điều này cho phép rút ngắn thời gian phân tích và giải quyết được các tồn tại liên quan đến việc phân tích mẫu độc tố axit domoic như tính đặc hiệu và thời gian kéo dài.

Kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người theo giải pháp ưu điểm là giới hạn phát hiện thấp (0,312 µg/100g) với giá thành giảm. Điều này cho phép hỗ trợ trong việc chẩn đoán nhanh các mẫu động vật biển bị nhiễm độc tố, giúp quản lý và giám sát môi trường cũng như nguồn thực phẩm từ động vật biển một cách hiệu quả, chính xác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất kit để phát hiện độc tố gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người (Amnesic Shellfish Poisoning: ASP), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* bằng cách chiết tảo đỏ bằng axit axetic 0,05M và tinh sạch bằng sắc ký cột, sau khi đông khô thu được độc tố axit domoic (DA) tinh sạch;

b) tạo phức hợp kháng nguyên cộng hợp bằng cách hòa độc tố axit domoic (DA) thu được từ bước a) trong nước cất và cho cộng hợp với disuccinimidyl suberat (DSS) trong CH_2Cl_2 , sau khi loại bỏ dung môi, thu được phức hợp DA-DSS dạng bột, tiếp đó cho phức hợp này cộng hợp với protein albumin huyết thanh bò (BSA) trong môi trường đệm PBS thu được phức hợp kháng nguyên cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA;

c) thu nhận kháng thể kháng độc tố axit domoic bằng cách ly tâm máu thu được từ thỏ đã được gây miễn dịch bằng phức hợp kháng nguyên cộng hợp N-DA-DSS-BSA thu được từ bước b) để thu huyết thanh, sau đó chuyển phần huyết thanh này lên cột sắc ký sepharosa 4B với pha rắn là độc tố axit domoic (DA) giải hấp bằng dung dịch Gly-Trys, độ pH=6,8 thu phân đoạn dương tính với chỉ thị là IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG), sau khi đông khô, thu được kháng thể kháng độc tố axit domoic tinh sạch;

d) tạo bề mặt tích hợp kháng nguyên pha rắn bằng cách bổ sung 160 nM axit domoic thu được từ bước a) vào bản nhựa bao gồm các giếng có diện tích 1cm^2 và đáy kín bằng màng mỏng, sau đó ủ bản nhựa ở 37°C trong 1 giờ, sau khi thu hồi dung dịch trong các giếng và rửa bằng dung dịch bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST) và bổ sung 300 μL dung dịch gelatin 3% và ủ tiếp trong 1 giờ ở 37°C và rửa lại bằng dung dịch PBST thu được bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn làm bề mặt rắn cho phản ứng; và

e) tạo kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người bằng cách đóng gói các thành phần bao gồm:

- độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* thu được từ bước a) với nồng độ 160nM;
- kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c);

- bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn thu được từ bước d);
- dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;
- chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);
- dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);
- hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và
- dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H₂SO₄.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước c) huyết thanh thỏ được pha loãng 15 lần bằng dung dịch đệm PBS trước khi tiến hành sắc ký để thu kháng thể kháng độc tố axit domoic.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng độc tố axit domoic thu được từ bước c) có nồng độ là 320nM.

4. Kit để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời không hồi phục ở người được sản xuất theo phương pháp nêu trong các điểm từ 1 đến 3, trong đó kit này bao gồm:

- độc tố axit domoic (domoic acid: DA) từ tảo đỏ *Chondria armata* với nồng độ 160nM;
- kháng thể kháng độc tố axit domoic cộng hợp có dạng N-DA-DSS-BSA;
- bản nhựa tích hợp kháng nguyên pha rắn với 160 nM axit domoic mỗi giếng;
- dung dịch đệm PBS có độ pH = 7,4;
- chỉ thị IgG của thỏ kháng dê được đánh dấu bằng peroxidaza của cây cải ngựa (HRP-labeled antigoat/rabbit IgG);
- dung dịch rửa bản nhựa bao gồm 1% Tween 20 pha trong đệm PBS có độ pH=7,4 (PBST);
- hóa chất tạo phức màu o-phenylenediamin dihydrochlorit (OPD); và
- dung dịch dừng phản ứng tạo màu 2N H₂SO₄.

5. Kit theo điểm 4, trong đó kit này còn bao gồm hướng dẫn sử dụng để phát hiện độc tố axit domoic gây mất trí nhớ tạm thời có trong sinh vật biển hoặc mẫu có nguồn gốc từ sinh vật biển.