

## Lựa chọn phương pháp xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme để phát hiện ô nhiễm dioxin

Đặng Phương Nam<sup>1,2</sup>, Nguyễn Văn Hoàng<sup>1</sup>, Phạm Kiên Cường<sup>1</sup>, Lê Thị Phương Hoa<sup>2</sup>, Lê Duy Khánh<sup>1</sup>, Nguyễn Khánh Hoàng Việt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ mới/Viện Khoa học và Công nghệ quân sự;

<sup>2</sup>Đại học Sư phạm Hà Nội.

\*Email: hoangviet1015@gmail.com

Nhận bài: 31/10/2022; Hoàn thiện: 12/11/2022; Chấp nhận đăng: 14/12/2022; Xuất bản: 20/12/2022.

DOI: <https://doi.org/10.54939/1859-1043.j.mst.VITTEP.2022.100-106>

### TÓM TẮT

Xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA) là một trong những phương pháp đang được nghiên cứu để đánh giá sàng lọc ô nhiễm dioxin bởi những ưu điểm nhanh chóng, chi phí thấp và dễ dàng thực hiện tại hiện trường. Hai phương pháp được quan tâm nhiều nhất là sandwich ELISA và ELISA cạnh tranh gián tiếp với những ưu điểm riêng. Vì vậy, việc nghiên cứu khảo sát khả năng phát hiện dioxin của các phương pháp ELISA là cần thiết. Nghiên cứu này đã bước đầu đánh giá khả năng phát hiện dioxin của 2 phương pháp ELISA với một số kháng thể kháng dioxin có sẵn trên thị trường. Kết quả cho thấy, kháng thể kháng dioxin CABT-L4232 có khả năng liên kết tốt với dioxin và hapten. Bước đầu nghiên cứu cho thấy, phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp có khả năng phát hiện dioxin ở nồng độ thấp nhất là 250 ppt, trong khi phương pháp sandwich ELISA có khả năng phát hiện dioxin ở nồng độ 1000 ppt trong dịch phân tích. Vì vậy, phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp được lựa chọn tiếp tục tối ưu để phân tích dioxin.

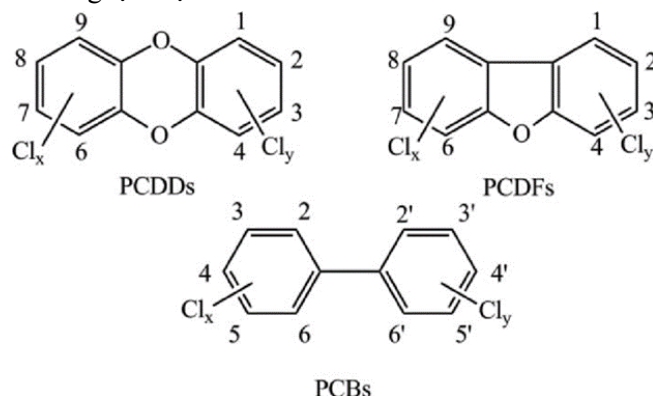
**Từ khóa:** ELISA cạnh tranh; Sandwich ELISA; Dioxin.

### 1. MỞ ĐẦU

Dioxin là nhóm chất được biết đến với khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường và là nhóm chất gây ung thư. Dioxin là nhóm các hợp chất hữu cơ bao gồm polychloro dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) và polychloro dibenzofurans (PCDFs). Một nhóm hợp chất khác-polychloro dibenzobiphenyls (PCBs) được sử dụng trong thời gian dài làm chất bôi trơn và làm mát thiết bị điện cũng có cấu trúc và tính chất tương tự dioxin và được gọi là nhóm các hợp chất giống dioxin. Chúng có cấu trúc chung gồm hai vòng benzene liên kết với nhau bởi nguyên tử oxygen hoặc liên kết C-C, với các vị trí chlorine hoá trên vòng benzene (hình 1). Độ độc của dioxin phụ thuộc vào số lượng và vị trí chlorine hoá. Các đồng phân chlorine hoá tại các vị trí carbon 2,3,7,8 có độc tính cao [3]. Dioxin có tính chất kị nước, ưa dầu, bền vững về mặt hoá học và có khả năng tích lũy sinh học [12]. Trong cơ thể sinh vật, dioxin bị chuyển hoá chậm bởi một số enzyme xenobiotic [9]. Dioxin được hình thành một cách không có chủ đích từ các hoạt động công nghiệp giấy, sản xuất hoá chất, thuốc trừ sâu, luyện kim và các hoạt động trong đời sống [3]. Nguồn ô nhiễm dioxin tại Việt Nam còn đến từ chiến dịch khai quang của quân đội Hoa Kỳ trong chiến tranh. Hiện nay, phần lớn các khu vực ô nhiễm dioxin đã nằm trong ngưỡng an toàn. Năm 2018, dự án xử lý ô nhiễm dioxin tại sân bay Đà Nẵng đã được thực hiện thành công và bàn giao lại 32,4 hecta đất đã xử lý vào tháng 11/2018 [12]. Tuy nhiên, Biên Hòa và Phù Cát vẫn là các điểm nóng về ô nhiễm dioxin với nồng độ dioxin trong mẫu đất và động vật thủy sinh rất cao [2].

Sắc ký khí ghép phổ khối phân giải cao (HRGC/HRMS) là phương pháp hiện đại và độ tin cậy cao nhất để phân tích ô nhiễm dioxin với khả năng phát hiện được chính xác nồng độ của 17 đồng phân dioxin độc nhất [8]. Mặc dù vậy, phương pháp này cũng có những hạn chế về yêu cầu thời gian thực hiện, khả năng phân tích ngoài thực tế và chi phí phân tích. Cùng với sự phát triển của các kháng thể kháng dioxin, các phương pháp miễn dịch đang được nghiên cứu và sử dụng để phát hiện dioxin, trong đó có xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA). ELISA là phương pháp sử

dụng khả năng liên kết giữa kháng thể và dioxin để phát hiện sự có mặt của dioxin trong mẫu. Tín hiệu được tạo thành nhờ phản ứng enzyme - cơ chất của enzyme được cộng hợp với kháng thể. Độ độc tương đương (TEQ) của mẫu được nội suy từ đường chuẩn với chất chuẩn là TCDD [7]. Đây là một phương pháp đơn giản, chi phí thấp với độ tin cậy cao trong việc phát hiện dioxin. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về sử dụng ELISA trong việc phân tích dioxin. Một số nghiên cứu của Sugawara và cộng sự đều lựa chọn phương pháp ELISA cạnh tranh để phát hiện dioxin và đã có kết quả khả quan khi có thể phát hiện 0,5 pg 2,3,7,8-TCDD/giếng [5]. Nghiên cứu của Shan và cộng sự đã thành công trong việc tổng hợp bán kháng nguyên phủ lên đĩa và sử dụng TMDD là một chất ít độc hơn TCDD để làm chất chuẩn thay thế [4]. Tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu trong lĩnh vực này. Một số nghiên cứu đã sử dụng sandwich ELISA trong việc phát hiện dioxin và bước đầu đánh giá được khả năng liên kết của các thành phần trong phản ứng [1]. Vì vậy, lựa chọn được phương pháp ELISA phù hợp trong phát hiện và sàng lọc nhanh các mẫu ô nhiễm dioxin trước khi được khẳng định trên thiết bị HRGC/HRMS là nghiên cứu vừa có giá trị về mặt kinh tế và ý nghĩa về mặt môi trường tại Việt Nam.



**Hình 1.** Cấu trúc của PCDDs, PCDFs và PCBs [10].

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, thiết bị

#### 2.1.1. Vật liệu

Một số hóa chất chính được sử dụng: Chất chuẩn 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) - 48599 (Sigma, Mỹ), thụ thể AhR RPB354Hu01 (Cloud-Clone, Mỹ), kháng thể kháng dioxin từ chuột ABIN934378 (Antibodies-online, Đức), CABT-L4232 (Creative Diagnostics, Mỹ) và YII-YM010-EX (Cosmobio, Nhật Bản), kháng thể đa dòng kháng IgG chuột cộng hợp HRP từ dê Ab6789 (Abcam, Anh), dung dịch cơ chất TMB T0440 (Sigma, Mỹ), hapten-BSA được tổng hợp theo phương pháp của Guomin Shan và cộng sự [4]. Các mẫu đất nhiễm dioxin được cung cấp từ Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga.

Các hoá chất pha đệm: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% (Merck), BSA, Tween 20, DMSO, Tris base (Biobasic), poly L-lysine 0,1%, Triton X-100 (Sigma), H<sub>2</sub>O deion.

Một số loại đệm sử dụng: Phosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,78 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L); đệm carbonate - bicarbonate pH 9,6 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g/L); đệm Tris 20 mM, NaCl 0,15M (pH 8). Các loại đệm sau khi pha được khử trùng 121°C trong 20 phút, bảo quản ở 4°C.

#### 2.1.2. 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).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp ELISA cạnh tranh gián tiếp

Tham khảo theo phương pháp cạnh tranh gián tiếp của Guomin Shan và cộng sự [4]. Đĩa ELISA được phủ bằng 100  $\mu\text{L}$  dung dịch hapten-BSA trong đệm carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,6, ủ ở 4 °C qua đêm. Rửa giếng 5 lần bằng 250  $\mu\text{L}$  đệm PBST (PBS 1X, Tween 20 0,05%). Giếng được chặn bằng 300  $\mu\text{L}$  dung dịch blocking (PBS 1X, BSA 0,5%) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa 3 lần bằng đệm rửa. 50  $\mu\text{L}$  mẫu (TCDD chuẩn hoặc dịch chiết mẫu đất được hoà tan trong đệm DMSO/H<sub>2</sub>O tỉ lệ 1/1 được bổ sung triton X-100 0,01%) và 50  $\mu\text{L}$  kháng thể kháng dioxin (nồng độ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trong đệm BSA 0,2% trong PBS) được trộn đều, ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng và bổ sung vào các giếng lặp lại 3 lần, ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa 5 lần, 100  $\mu\text{L}$  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. 100  $\mu\text{L}$  dung dịch cơ chất TMB được bổ sung vào các giếng và được ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút trong tối, tránh ánh sáng đến khi chuyển màu xanh. Phản ứng enzyme - cơ chất được dừng lại bằng 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Tín hiệu được đo ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc đĩa ELISA.

### 2.2.2. Phương pháp sandwich ELISA

Tham khảo phương pháp sandwich ELISA và các điều kiện tối ưu trong một số nghiên cứu [1]: Giếng được ủ với poly L-lysine 0,01% ở 37 °C trong 1 giờ, sau đó được rửa 1 lần với 200  $\mu\text{L}$  đệm rửa. 100  $\mu\text{L}$  thụ thể AhR 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trong đệm Tris 20 mM, NaCl 0,15M (pH 8) được thêm vào giếng và ủ ở 4 °C qua đêm. Giếng sau khi ủ với thụ thể AhR sẽ được loại bỏ dịch và ủ với 200  $\mu\text{L}$  dung dịch BSA 1% trong đệm PBS trong 2 giờ ở 37 °C. Sau bước ủ và loại bỏ dịch, 100  $\mu\text{L}$  TCDD hoặc dịch chiết mẫu đất trong đệm DMSO 1%, BSA 1% trong H<sub>2</sub>O được bổ sung vào giếng và ủ trong 1 giờ ở 37 °C. Giếng sau khi ủ được rửa 4 lần với 200  $\mu\text{L}$  đệm rửa. 100  $\mu\text{L}$  kháng thể kháng dioxin nồng độ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trong đệm BSA 1% trong PBS được bổ sung vào mỗi giếng. Các giếng được ủ 1 giờ ở 37 °C. Sau 4 lần rửa với 200  $\mu\text{L}$  đệm rửa, 100  $\mu\text{L}$  dung dịch kháng thể cộng hợp HRP nồng độ 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trong đệm BSA 1% trong PBS được thêm vào mỗi giếng và được ủ 1 giờ ở 37 °C. Các giếng được rửa 10 lần với 200  $\mu\text{L}$  đệm rửa. Giếng được thấm khô hoàn toàn sau mỗi bước rửa. 50  $\mu\text{L}$  TMB được bổ sung vào các giếng bằng pipet đa kênh. Đĩa được ủ ở 37 °C, tránh ánh sáng. Sau 2,5 giờ ủ, phản ứng enzyme được dừng lại bằng 50  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N với trình tự như khi bổ sung cơ chất. Tín hiệu được đo bằng máy đọc đĩa ELISA ở bước sóng 450 nm ngay sau khi bổ sung dung dịch dừng.

### 2.2.3. Phương pháp lựa chọn kháng thể kháng dioxin phù hợp

Các kháng thể kháng dioxin được chuẩn bị với nồng độ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trong đệm phù hợp và được sử dụng để phát hiện TCDD 1000 ppt bằng phương pháp sandwich ELISA theo mục 2.2.1 và ELISA cạnh tranh theo mục 2.2.2. Các kháng thể cho tín hiệu OD<sub>450</sub> cao và có khả năng phát hiện TCDD sẽ được lựa chọn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### 2.2.4. Phương pháp đánh giá ngưỡng phát hiện của hai phương pháp ELISA

Mẫu chứa TCDD được pha trong đệm phù hợp và được phân tích hàm lượng dioxin bằng phương pháp sandwich ELISA theo mục 2.2.1 và phương pháp ELISA cạnh tranh theo mục 2.2.2. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được phân tích bằng kiểm định T-test để xác định ngưỡng phát hiện.

### 2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng phát hiện dioxin trong mẫu chiết thực tế

Các mẫu đất nhiễm dioxin do Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga cung cấp được tách chiết theo quy trình chuẩn bị mẫu cho phân tích HRGC/HRMS qua 3 giai đoạn: chiết Soxhlet, acid hoá và sắc ký qua cột silicagel đa lớp. Quy trình tách chiết và làm sạch mẫu được thực hiện tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga. Mẫu dịch chiết dioxin trong hexan được chia làm 2 phần bằng nhau: một phần được xác định nồng độ dioxin tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga, phần còn lại được

chuyển dung môi bằng cách thêm một thể tích dung dịch pha loãng mẫu phân tích ELISA và làm bay hơi hoàn toàn hexan bằng máy thổi khô mẫu bằng khí nitrogen [5]. Sau đó, phần dịch được phân tích bằng phương pháp ELISA. Phương pháp ELISA cho kết quả tin cậy hơn sẽ được lựa chọn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Lựa chọn kháng thể kháng dioxin phù hợp

Phương pháp ELISA được phát triển dựa trên khả năng liên kết của kháng nguyên và kháng thể. Đây là bước đầu tiên và quan trọng, quyết định sự thành công của phản ứng. Vì vậy, ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên (dioxin) cần được khảo sát. Cả ba kháng thể kháng dioxin được đánh giá ái lực với dioxin bằng cả hai phương pháp ELISA (bảng 1).

*Bảng 1. Tín hiệu OD<sub>450</sub> của các kháng thể sử dụng phương pháp ELISA.*

Kháng thể	<i>Sandwich ELISA</i>		<i>ELISA cạnh tranh</i>	
	Đối chứng	TCDD	Đối chứng	TCDD
ABIN934378	0,197 ± 0,003	0,236 ± 0,045	0,151 ± 0,004	0,147 ± 0,008
CABT-L4232	0,164 ± 0,016	0,469 ± 0,021	3,760 ± 0,050	3,485 ± 0,028
YII-YM010-EX	0,136 ± 0,029	0,163 ± 0,006	0,157 ± 0,009	0,146 ± 0,005

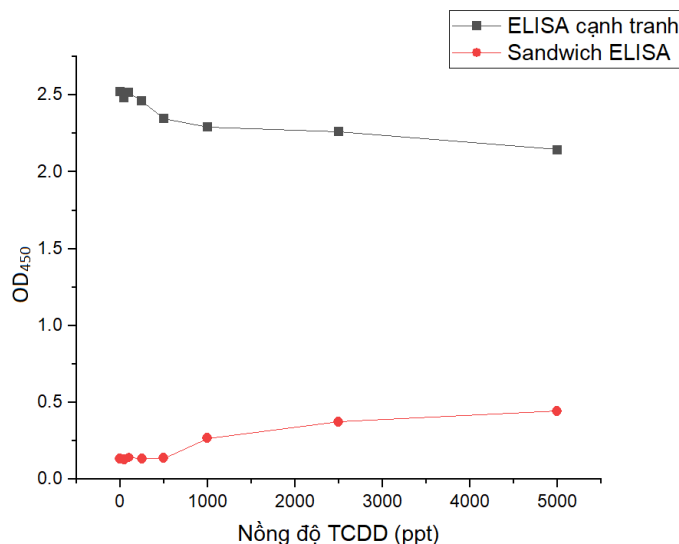
Trong 3 kháng thể được khảo sát, kháng thể CABT-L4232 có khả năng liên kết với các thành phần trong phản ứng ELISA tốt hơn hai kháng thể còn lại. Tín hiệu OD<sub>450</sub> cao nhất của kháng thể CABT-L4232 trong phản ứng ELISA sandwich là 0,469 ± 0,021 và trong phản ứng ELISA cạnh tranh là 3,760 ± 0,050. Hai kháng thể còn lại vẫn có tín hiệu OD<sub>450</sub>, tuy nhiên, giá trị thấp và nằm trong khoảng 0,1 - 0,2. Nguyên nhân của sự khác nhau đó có thể do ái lực khác nhau của các kháng thể với dioxin hoặc bán kháng nguyên phủ trên đĩa. Trong một số nghiên cứu, dioxin liên kết với protein được sử dụng làm kháng nguyên sinh miễn dịch. Sau đó, các kháng thể tạo thành được đánh giá ái lực với dioxin tự do và cho kết quả khác nhau giữa các dòng kháng thể [5]. Do đó, khi sử dụng dioxin là kháng nguyên, ái lực của kháng thể có thể bị giảm đi. Trong thí nghiệm này, kháng thể CABT-L4232 có ái lực cao hơn với dioxin và bán kháng nguyên phủ trên đĩa nên sẽ được lựa chọn cho cả hai phương pháp ELISA.

#### 3.2. Đánh giá ngưỡng phát hiện của hai phương pháp ELISA

Ngưỡng phát hiện là nồng độ dioxin thấp nhất có thể phát hiện được và phụ thuộc vào ái lực của kháng thể và dioxin. Kháng thể CABT-L4232 được xác định ngưỡng phát hiện với cả hai phương pháp ELISA (hình 2). Trong thí nghiệm này, nồng độ dioxin cho tín hiệu khác biệt với tín hiệu của mẫu đối chứng được xác định là ngưỡng phát hiện của phương pháp ELISA.

Trong phản ứng sandwich ELISA, dioxin sẽ được giữ lại nhờ các thụ thể gắn trên giếng, theo sau là sự liên kết của kháng thể kháng dioxin và kháng thể cộng hợp enzyme. Các thành phần không liên kết bị loại bỏ. Cuối cùng, dung dịch cơ chất được thêm vào để tạo tín hiệu [11]. Do đó, tín hiệu OD<sub>450</sub> của phương pháp sandwich ELISA sẽ tăng lên khi tăng nồng độ dioxin trong mẫu. Tại nồng độ TCDD 1000 ppt, tín hiệu của phản ứng bắt đầu tăng lên và có sự khác biệt đối với mẫu đối chứng (OD<sub>450</sub> của mẫu đối chứng là 0,135 ± 0,008 và OD<sub>450</sub> của mẫu TCDD 1000 ppt là 0,268 ± 0,077). Ngược lại với phương pháp sandwich ELISA, tín hiệu của phương pháp ELISA cạnh tranh được tạo thành nhờ kháng thể không liên kết với dioxin được giữ lại trên đĩa nhờ liên kết với bán kháng nguyên gắn trên đĩa, còn các kháng thể liên kết với dioxin sẽ bị rửa trôi [7]. Do đó, tín hiệu OD<sub>450</sub> của mẫu đối chứng sẽ cao và tín hiệu của các mẫu dioxin sẽ giảm dần. Tín hiệu của phản ứng ELISA cạnh tranh giảm dần từ mẫu có nồng độ TCDD 250 ppt và thấp hơn tín hiệu của mẫu đối chứng (OD<sub>450</sub> của mẫu đối chứng là 2,519 ± 0,016 và OD<sub>450</sub> của mẫu TCDD 250 ppt là 2,462 ± 0,043). Như vậy, phương pháp ELISA cạnh tranh cho tín hiệu OD<sub>450</sub> cao hơn phương pháp sandwich ELISA nhờ khả năng khuếch đại tín hiệu của các mẫu

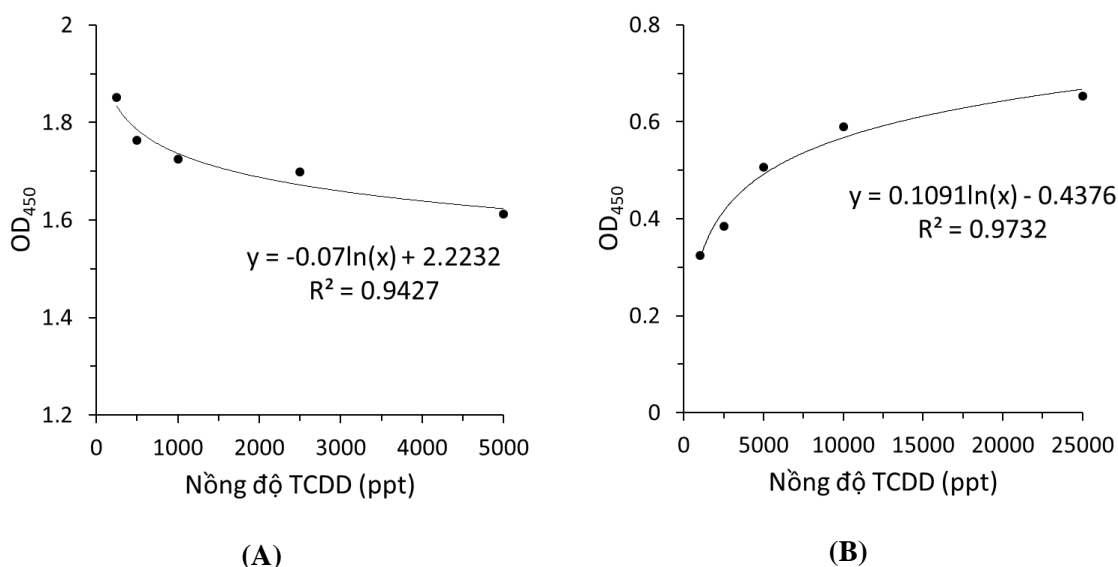
dioxin nồng độ thấp. Ngưỡng phát hiện dioxin của phương pháp sandwich ELISA và ELISA cạnh tranh lần lượt là 1000 ppt và 250 ppt. Kết quả này cao hơn so với các nghiên cứu của Sugawara khi nghiên cứu về giới hạn phát hiện thấp nhất của phương pháp ELISA cạnh tranh là 0,5 pg/giếng (tương đương mẫu TCDD nồng độ 10 ppt) [5]. Vì vậy, cần có các nghiên cứu tiếp theo để giảm ngưỡng phát hiện, tăng độ nhạy của phương pháp ELISA.



Hình 2. Khả năng phát hiện dioxin của 2 phương pháp ELISA.

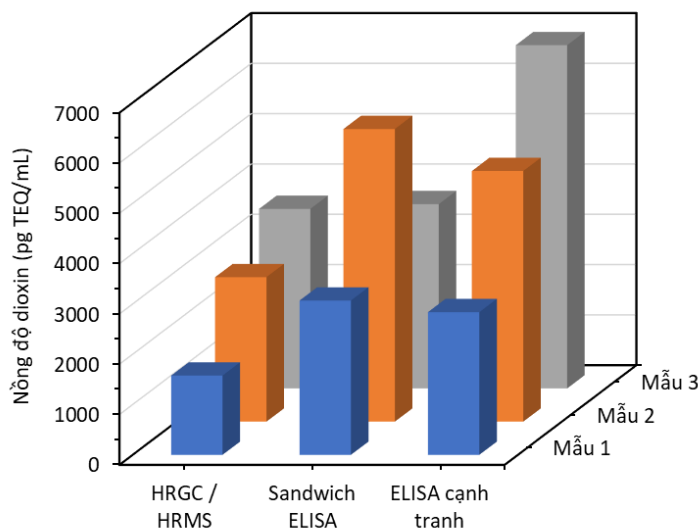
### 3.3. Đánh giá khả năng phát hiện dioxin trong mẫu thực tế

Hai phương pháp ELISA được sử dụng để đánh giá khả năng phát hiện dioxin trong mẫu thực tế. Đường chuẩn dioxin được xây dựng cho cả hai phương pháp làm cơ sở để tính toán nồng độ tương đối của dioxin có trong mẫu (hình 3).



Hình 3. Đường chuẩn dioxin của hai phương pháp ELISA  
(A) Sandwich ELISA; (B) ELISA cạnh tranh.

Mẫu dịch chiết được chuẩn bị theo phương pháp chuẩn bị mẫu cho phân tích HRGC/HRMS và xác định hàm lượng dioxin bằng phương pháp ELISA và HRGC/HRMS. Do mẫu được chuẩn bị trong hexan nên cần có bước chuyển dung môi sang đậm pha mẫu để phù hợp cho phản ứng ELISA. Kết quả phân tích HRGC/HRMS của các mẫu đất 1, 2, 3 lần lượt là 1576,14 ppt, 2872,17 ppt và 3568,63 ppt. Nồng độ dioxin của các mẫu 1, 2, 3 lần lượt là 3067,14 ppt, 5817,24 ppt và 3663,19 ppt khi phân tích bằng phương pháp sandwich ELISA. Phương pháp ELISA cạnh tranh cũng cho kết quả cao với các giá trị tương ứng là 2837,05 ppt, 4982,76 ppt và 6823,62 ppt (hình 4). Cả hai phương pháp ELISA cho kết quả cao hơn kết quả HRGC/HRMS. Nguyên nhân là do phương pháp ELISA dễ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường và sai số cao hơn do tín hiệu đo phụ thuộc vào phản ứng enzyme và cơ chất. Một nguyên nhân khác là do kháng thể có phản ứng chéo với các đồng phân khác trong nhóm dioxin. Một số nghiên cứu đã khẳng định kháng thể kháng dioxin có phản ứng chéo với các đồng phân trong nhóm dioxin [4, 5]. Hầu hết các nghiên cứu đều có sự sai lệch nhất định giữa kết quả ELISA và HRGC/HRMS, trong đó, kết quả ELISA thường cao hơn [4]. Mặc dù vậy, phương pháp đã xác định được sự có mặt của dioxin với nồng độ cao trong mẫu dịch chiết. Vì vậy, ELISA có thể được sử dụng cho các mục đích phát hiện và sàng lọc ô nhiễm dioxin.



**Hình 4.** So sánh kết quả phân tích trên thiết bị HRGC/HRMS và ELISA.

#### 4. KẾT LUẬN

Cả hai phương pháp ELISA đều có khả năng phát hiện dioxin khi sử dụng kháng thể CABT-L4232. Tuy nhiên, phương pháp sandwich ELISA có tín hiệu thấp và giới hạn phát hiện cao hơn phương pháp ELISA cạnh tranh. Khi phân tích mẫu thực tế, kết quả phân tích của phương pháp ELISA cũng có độ tin cậy. Dựa vào những ưu điểm của phương pháp ELISA cạnh tranh như khả năng khuếch đại tín hiệu với mẫu có nồng độ dioxin thấp, tín hiệu OD<sub>450</sub> cao và khả năng rút ngắn thời gian thao tác nhờ việc chế tạo và bảo quản đĩa phủ hapten, phương pháp này được lựa chọn để tiếp tục phát triển, chế tạo bộ kit phát hiện nhanh dioxin nhằm mục đích phát hiện và sàng lọc các mẫu nhiễm dioxin trước khi được khẳng định trên thiết bị HRGC/HRMS.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. T. T. Quỳnh và cộng sự, “Nghiên cứu thăm dò phát hiện dioxin bằng phương pháp sandwich ELISA,” TC Nghiên cứu KHCNQS, **tập 66**, số 4, tr. 123-130, (2020).

- [2]. Văn phòng 701, Bộ Quốc phòng, Học Viện Quân y, “Kỷ yếu hội thảo quốc tế về khắc phục hậu quả của đất da cam/dioxin đối với con người và môi trường,” tr. 298, (2018).
- [3]. K. S. Prashant, “Dioxin,” Encyclopedia of Environmental Health, 2<sup>nd</sup> edition (2019), pp. 125-134.
- [4]. G. Shan et al, “Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota sample,” J. Analytica Chimica Acta **Vol. 444**, pp. 169-178, (2001).
- [5]. Y. Sugawara et al, “Development of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Polyclonal Antibodies for the Detection of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins,” J. Analytical chemistry **Vol. 70**, pp. 1092-1099, (1998).
- [6]. Y. Sugawara et al, “Improvement of the long-term stability for dioxin toxicity evaluation method by enzyme-linked immunosorbent assay,” J. Immunoassay and Immunochemistry, **Vol. 31**, pp. 111-119, (2010).
- [7]. W. Tian et al, “Immunoanalysis methods for the detection of dioxins and related chemicals,” J. Sensors (Basel) **Vol. 12**, no. 12, pp. 16710-31, (2012).
- [8]. United States Environmental Protection Agency, “Region II Method 1613B: CDDs/CDFs by isotope Dilution using HRGC/HRMS,” (2010).
- [9]. R. A. Young, “Dioxins,” Encyclopedia of Toxicology, 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press, pp. 190-194, (2014).
- [10]. M. Zhang et al, “Open burning as a source of dioxins,” J. Environmental Science and Technology, **Vol. 47**, no. 8, pp. 543-620, (2017).
- [11]. <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.
- [12]. <https://www.usaid.gov/vi/vietnam/environmental-remediation-process>.

#### ABSTRACT

##### **Selection of an enzyme-linked immunoassay method to detect dioxin contamination in the environment**

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the methods being studied for screening for dioxin contamination because of the advantages of rapid, low cost and easy in-field implementation. The two methods of most interest are sandwich ELISA and indirect competitive ELISA with their own advantages. Therefore, it is necessary to study and investigate the dioxin detection ability of ELISA methods. This research initially evaluated the ability to detect dioxin of two ELISA methods with some commercially available anti-dioxin antibodies. The results showed that the anti-dioxin CABT-L4232 antibody had good binding ability to dioxins and hapten. Initially, the study showed that the indirect competitive ELISA method was capable of detecting dioxins at a concentration of 250 ppt, while the sandwich ELISA method was capable of detecting dioxins at a concentration of 1000 ppt in the analytical solution. Therefore, the indirect competitive ELISA method was chosen to continue to be optimal for dioxin analysis.*

**Keywords:** Competitive ELISA; Sandwich ELISA; Dioxin.