

## ỨNG DỤNG SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH ĐỀ TINH CHẾ KHÁNG THỂ KHÁNG ĐỘC TỔ DOMOIC ACID TRONG HUYẾT THANH THỎ TRẮNG NEW ZEALAND

Đào Việt Hà\*, Phạm Xuân Kỳ

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*E-mail: daovietha69@gmail.com

Ngày nhận bài: 24-6-2016

**TÓM TẮT:** Nhằm phục vụ phát triển bộ KIT ELISA phát hiện nhanh độc tố vi tảo domoic acid trong sản phẩm thủy sản tại Việt Nam, kháng thể kháng độc tố này đã được sản xuất bằng liệu pháp miễn dịch trên thỏ trắng New Zealand. Với ưu điểm có khả năng tinh sạch nhanh và cô đặc kháng thể, phương pháp sắc ký ái lực được lựa chọn để tinh chế kháng thể từ huyết thanh thỏ sau miễn dịch nhằm đáp ứng yêu cầu sử dụng làm vật liệu cho KIT ELISA. Tuy nhiên, do domoic acid là một bán kháng nguyên (hapten) nên không thể áp dụng nguyên tắc miễn dịch thông thường trong chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch sử dụng độc tố này làm giá bắt kháng thể. Bài báo này trình bày kết quả thử nghiệm chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch sepharose omega-aminohexyl với giá bắt kháng thể là bán kháng nguyên domoic acid để tinh chế kháng thể kháng domoic acid trong huyết thanh thỏ. Sử dụng cầu nối hóa học dissuccinyl substrate để tạo khả năng bắt kháng thể của phân tử domoic acid; sau đó, trên nguyên tắc kết hợp gốc carboxyl của phân tử domoic acid với gốc carbodiimide của hạt sepharose omega-aminohexyl, chúng tôi đã chế tạo thành công cột sắc ký ái lực bắt kháng thể kháng domoic acid với hiệu suất thu hồi đạt  $91,5 \pm 1,5\%$  ( $n = 3$ ) khi thử nghiệm với kháng thể chuẩn. Sử dụng cột sắc ký ái lực này với dịch giải cột lần lượt là NaCl 0,5 M; PBS 0,1 M và Ldy-HCl (pH 2,7) 0,1 M; đã thu nhận được kháng thể kháng domoic acid từ huyết thanh thỏ. Western Blot với kháng thể đặc hiệu HRP-labeled anti-goat IgG cho thấy, sản phẩm kháng thể thu nhận được từ quy trình này đạt độ tinh sạch làm vật liệu cho KIT ELISA.

**Từ khóa:** Domoic acid, hiệu suất, kháng thể, sắc ký ái lực, tinh sạch.

### MỞ ĐẦU

Domoic acid (DA) là một amino amin với khối lượng phân tử 312 đvC, công thức phân tử  $C_{15}H_{21}NO_6$ , có ba nhóm carboxyl (-COOH), tồn tại ở dạng tinh thể, tan trong nước và có tính axit [1]. DA gây ra triệu chứng mất trí nhớ trong thời gian ngắn nhưng không hồi phục là biểu hiện đặc trưng của ngộ độc ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) ở người [2, 3]. Cho đến thời điểm hiện nay đã xác định được 17 loài *Pseudo-nitzschia*, 1 loài *Nitzschia* và 1 loài *Amphora* có khả năng sản sinh DA [4, 5]. Giới

hạn an toàn của độc tố DA trong sản phẩm hải sản được các quốc gia chấp nhận là 20  $\mu\text{g/g}$  mô mềm [6]. Takata và nnk., [7] đã phát hiện hàm lượng DA vượt quá ngưỡng an toàn thực phẩm trong giống nhuyễn thể Hàu hương *Spondylus* tại vùng biển Costa Rica, Nhật Bản, Thái lan, Philippines và Việt Nam. Dao và nnk., [8] đã công bố kết quả hàm lượng DA rất cao (150  $\mu\text{g}/100$  g mô mềm) trong loài *Spondylus versicolor* tại đầm Nha Phu, Khánh Hòa, Việt Nam. Mặt khác, một số công bố mới nhất [9, 10] đã phát hiện 2 loài vi tảo silic *Pseudo-nitzschia cf. caciaantha* và *P. fukuyoi* tại Việt

Nam có khả năng sản sinh DA. Những phát hiện này cho thấy nguy cơ ngộ độc DA tại nước ta đang ở mức độ cần cảnh báo.

Kiểm soát an toàn thực phẩm về mặt các độc tố vi tảo trong sản phẩm thủy sản tại Việt Nam là một trong những tiêu chuẩn cần thiết phục vụ nhu cầu thị trường quốc tế và nội địa. Cho đến thời điểm hiện nay, phương pháp phổ biến sử dụng cho mục đích giám sát độc tố là thử nghiệm sinh học trên chuột (Mouse Bioassay-MBA) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC). Mặc dù có các ưu điểm như thời gian thử nghiệm nhanh, giá thành rẻ; MBA cũng có khá nhiều nhược điểm như sai số khá lớn ( $\pm 20\%$ ), phụ thuộc vào nguồn sinh vật thử nghiệm là dòng chuột nhắt trắng *Swiss swiss* (cung cấp bởi một số cơ sở y tế như Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Viện Vệ sinh dịch tễ...). Đặc biệt, giới hạn phát hiện của MBA đối với độc tố DA là  $150 \mu\text{g/g}$  mô mềm [6], trong khi ngưỡng an toàn thực phẩm của độc tố này trong sản phẩm hải sản là  $20 \mu\text{g/g}$ , do vậy, không thể sử dụng MBA đánh giá mức độ an toàn thực phẩm đối với độc tố này. Những thực tế nêu trên cho thấy cần thiết phải có một phương pháp thử nghiệm sinh học ưu việt hơn để thay thế MBA tại Việt Nam.

Phương pháp miễn dịch học sử dụng enzym gắn kết (Enzyme-Linked Immunoassay - ELISA) được đánh giá có tiềm năng là một trong những chọn lựa của Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống (Association of Official Analytical Chemists-AOAC) cho phương pháp chuẩn quốc tế thay thế MBA với những ưu điểm về giới hạn phát hiện thấp, độ chính xác cao. Để có kết quả nhanh ELISA đối với độc tố DA, điều đầu tiên là phải có nguồn kháng thể đặc hiệu kháng lại độc tố DA và quy trình sản xuất nguồn kháng thể kháng DA bằng liệu pháp gây miễn dịch trên thỏ trắng New Zealand đã được thực hiện. Tuy nhiên, kháng thể được sản sinh theo phương pháp này là kháng thể đa dòng, thậm chí còn lẫn nhiều tạp chất [11]. Trong khi đó, để chế tạo bộ kit ELISA, cần phải có chế phẩm kháng thể ở dạng tinh sạch. Sắc ký ái lực (IAC) được phát triển trong hóa sinh miễn dịch nhằm tinh sạch các kháng nguyên/kháng thể do ưu điểm bắt giữ tốt, cho

phép phân tách protein dạng nguyên thủy còn hoạt tính [12, 13]. Omega-aminohexyl (EAH 4B) là loại hạt sepharose có gốc carboxyl và thiol được sử dụng để gắn kết các hợp chất có chứa gốc carboxyl lên hạt sepharose 4B thông qua việc gắn với gốc carbodiimide của phân tử carbon ở vị trí số 11 của hạt. Kháng nguyên được gắn lên giá rỗng của cột sắc ký sepharose EAH 4B, tạo cho IAC này có đặc tính vừa có thể tinh sạch vừa có đặc kháng thể [14]. Tuy nhiên, khó khăn khi ứng dụng IAC để tinh chế kháng thể kháng DA là độc tố này chỉ có 1 nhóm amin thứ cấp (-NH), không kết hợp trực tiếp với nhóm -COOH của kháng thể cần tinh chế. Do đó, không thể sử dụng trực tiếp DA làm giá bắt kháng thể của cột sắc ký ái lực miễn dịch. Để khắc phục: Trước tiên, DA cần được gắn với một cầu nối hóa học thích hợp sao cho phức hợp này có thể kết hợp với nhóm -COOH của kháng thể sau này nhưng vẫn mang tính đặc hiệu của DA; sau đó gắn phức hợp đó lên cột IAC theo nguyên tắc phản ứng của -COOH của DA với nhóm carbodiimide của hạt EAH 4B. Disuccinimidyl Suberate (DSS) có 2 gốc amine-reactive N-hydroxysuccinimide (-NHS) ester ở vị trí phân tử carbon số 8 ở 2 đầu [15]. Gốc này có ái lực hóa học mạnh đối với gốc -NH<sub>2</sub> ở chuỗi cạnh của phân tử lysin K và nguyên tử N ở điểm cuối cùng của mỗi chuỗi polypeptide trong các protein bao gồm kháng thể [15]. Do đó, DSS được chọn là cầu nối liên kết với DA để tạo phức hợp DA-DSS có thể kết hợp với nhóm -NH<sub>2</sub> của phân tử kháng thể cần tinh chế.

Bài báo này trình bày kết quả thử nghiệm chế tạo cột sắc ký ái lực (IAC) sepharose EAH 4B với giá bắt kháng thể là bán kháng nguyên DA để tinh chế kháng thể kháng DA trong huyết thanh thỏ, trên cơ sở ứng dụng các nguyên tắc phản ứng hóa học trong sắc ký miễn dịch [11, 14] với các bước bổ sung chuyên biệt cho bán kháng nguyên DA [16].

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Cộng hợp kháng nguyên DA lên polymer Sepharose EAH và tạo cột IAC

*Hoạt hóa hạt EAH 4B và chuẩn bị cột sắc ký: Ly tâm 7 ml dung dịch hạt sepharose EAH*

4B (GE Healthcare, Gelifescience, Nhật Bản, 17-0569-01) trong 10 phút với tốc độ 1.000 vòng/phút; loại bỏ phần dịch trong, thu nhận 2 ml dung dịch hạt gel đậm đặc. Thêm 4 ml dịch gốc hạt EAH 4B, lặp lại bước ly tâm và thu nhận hạt đậm đặc như trên. Tiếp tục quy trình này (3-4 lần) cho đến khi tổng thể tích hạt đậm đặc sau ly tâm đạt 7 ml. Rửa dung dịch hạt này 4 lần bằng nước cất, sau đó cân bằng với dung dịch đệm phosphate (PB) (pH 7,0). Chuyển hỗn hợp trên sang cột sắc ký thủy tinh ( $2,0 \times 15$  cm), rửa bằng 100 ml nước cất, giữ hạt EAH 4B luôn ướt ở  $4^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

**Chuẩn bị dung dịch domoic acid:** Hòa tan 2 mg DA chuẩn thương mại (TOCRIS, Anh, 14277-97-5) trong 1 thể tích nhỏ nước cất ( $< 1$  ml); hiệu chỉnh pH 6-7 bằng dung dịch natri cacbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M.

**Chuẩn bị dung dịch Disuccinimidyl Suberate:** Hòa tan 20 mg DSS (THERMO, USA, 68528-80-3) trong 1,6 ml N,N-dimethylformamide (DMF) (WAKO, Nhật Bản, 048-27585).

**Tạo phức hợp DA-DSS:** Trộn dung dịch DA và dung dịch DSS, lắc đều, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Thêm vào hỗn hợp này một thể tích nhỏ dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), lắc đều để lắng cho đến khi phân thành 2 lớp chất lỏng bao gồm lớp dưới là DMF có chứa DSS dư thừa; lớp trên là nước cất có chứa DA-DSS. Loại lớp dưới, giữ lại lớp trên bằng phễu chiết, dùng khí  $\text{N}_2$  để loại  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  dư sau phản ứng.

**Tạo giá ái lực bắt kháng thể kháng DA:** Trộn hỗn hợp 5 ml hạt EAH 4B đã được chuẩn bị như trên và phức hợp DA-DSS, giữ ở điều kiện  $5^{\circ}\text{C}$  qua đêm cho phản ứng hoàn toàn. Chuyển toàn bộ dung dịch sau phản ứng sang cột sắc ký thủy tinh ( $2,0 \times 15$  cm), rửa bằng 100 ml nước cất, sau đó bằng 100 ml dung dịch đệm phosphate buffer saline (PBS) 0,1 M. Hiệu suất của phản ứng được tính toán dựa vào kiểm tra hàm lượng DA dư (nếu có) trong dung dịch bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò tia cực tím (UV-HLPC) [17].

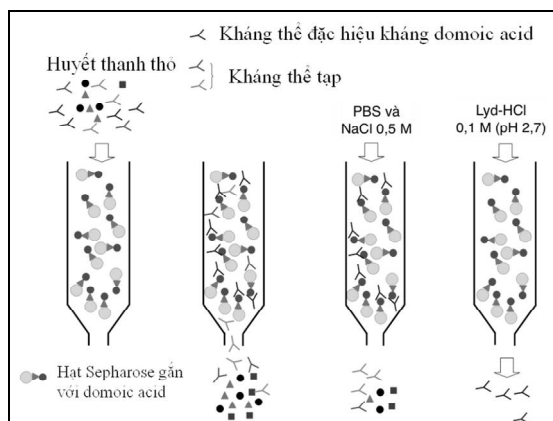
**Xác định hiệu suất thu hồi của cột IAC đối với kháng thể kháng DA:** Dùng pipette Pasteur bơm từ từ 2 ml huyết thanh có nồng độ kháng

thể kháng DA 1 mg/ml (do đại học Kitasato, Nhật Bản cung cấp) lên cột IAC, rửa bằng 20 ml dung dịch đệm PBS 0,1 M (pH 7,4). Sau đó, rửa giải lần lượt bằng 20 ml dung dịch NaCl 0,5 M; 20 ml dung dịch đệm PBS 0,1 M và cuối cùng là 100 ml dung dịch đệm Lys-HCl (pH 2,7) 0,1 M (0,75 g Glycin trong 90 ml nước cất, hiệu chỉnh pH 2,7 bằng HCl 0,1 M, định mức bằng nước cất đến thể tích 100 ml), với tốc độ dòng 1 ml/phút. Thu các phân đoạn 2 ml, hiệu chỉnh pH 7,0 bằng 40  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm Tris 1,0 M. Kiểm tra mật độ quang (OD) của các phân đoạn ở bước sóng 280 nm, thu các phân đoạn có chỉ số OD cao, thẩm tích qua đêm với 1.000 ml dung dịch đệm PBS (-) (pH 7,4), sau đó đông khô để thu nhận kháng thể tinh sạch. Tính toán lượng kháng thể trước và sau khi qua cột bằng cách so sánh với hệ số chuẩn của IgG (dung dịch 1 mg/ml IgG sẽ có chỉ số OD là 1,40 ở bước sóng 280 nm) [18]. Từ số liệu này tính được hiệu suất thu hồi của cột chế tạo đối với kháng thể kháng DA.

Quy trình trên được lặp lại 3 lần thí nghiệm riêng biệt với từng 2 mg DA chuẩn ban đầu để tạo 3 cột sắc ký ái lực miễn dịch tương ứng.

### Tinh sạch kháng thể kháng DA trong huyết thanh thô trắng bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch với giá bắt kháng thể là DA-DSS

10 ml huyết thanh thô trắng thu nhận từ thí nghiệm gây miễn dịch [19] được cho chảy qua cột IAC tương tự như quy trình đã mô tả ở trên và theo mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tinh chế kháng thể kháng độc tố domoic acid trong huyết thanh thô trắng bằng sắc ký ái lực với pha rắn là domoic acid

*Kiểm tra độ sạch của chế phẩm kháng thể:*

Độ sạch của sản phẩm kháng thể được kiểm tra bằng phương pháp Western Blot sử dụng kháng thể thương mại 2<sup>nd</sup> antibody IRDye 680RD Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L) (DAKO, Đan Mạch, P0399) như là chỉ thị đặc hiệu, cụ thể như sau:

Sản phẩm đông khô của kháng thể được hòa tan lại trong 1 ml đệm PBS 0,1 M (pH 7,4), điện di SDS (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)-PAGE (Bio Craft Model BE-220) (buồng đôi) với gel phân tách là acrylamide 15% trong 1 giờ 30 phút. Gel SDS-PAGE thứ 1 được nhuộm với dung dịch Coomassie Brilliant Blue (CBB; C<sub>47</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>) (0,5 g CBB pha trong hỗn hợp dung dịch bao gồm 100 ml acetic acid, 500 ml methanol và 400 ml nước cất), trên máy lắc, qua đêm ở nhiệt độ phòng. Gel SDS-PAGE thứ 2 được chuyển qua màng Immobilon-P Transfer Membrane (PVDF, kích thước lỗ 0,45 μm) bằng thiết bị chuyển màng Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad) ở cường độ dòng điện 100 mV trong 1 giờ 15 phút. Sau đó, nhuộm màng PVDF với kháng thể đặc hiệu the 2<sup>nd</sup> antibody IRDye 680RD Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L) trong 1 giờ ở điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ phòng. Hình ảnh màng PVDF sau nhuộm được ghi lại bằng hệ thống Odyssey Western Blot Blocker (LI-COR Model 2800) ở bước sóng 700 nm với dung dịch hiện màu huỳnh quang đặc biệt Chemi-Lumi One (Nakarai, Nhật Bản, 05027-20).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch với giá bắt kháng thể là DA**

Bằng phân tích sắc ký lỏng cao áp đầu dò tia cực tím (HPLC-UV), không phát hiện được DA dư trong 2 trong số 3 thí nghiệm độc lập với mỗi 2 mg DA cơ chất phản ứng ban đầu, như vậy có thể nói toàn bộ lượng 2 mg DA ban đầu trong 2 thí nghiệm này tham gia phản ứng hoàn toàn. Tuy nhiên, một lượng DA rất nhỏ (10 μg) được phát hiện trong dung dịch sau phản ứng tạo phức DSS-DA-EAH 4B của 1 trong 3 thí nghiệm này và hiệu suất phản ứng của thí nghiệm này đạt 99,5%. Theo tính toán từ số liệu thực nghiệm, hiệu suất của phản ứng

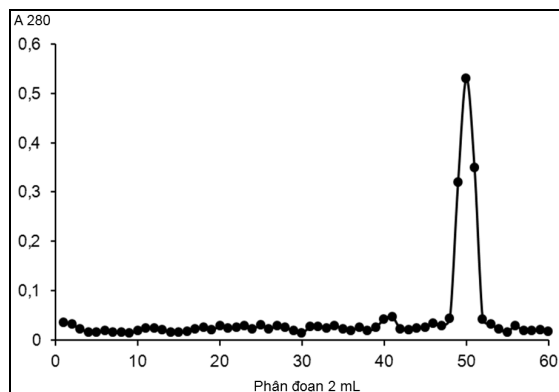
cộng hợp phức hợp DSS-DA với hạt EAH 4B đạt giá trị trung bình là 99,83% (n=3) (bảng 1).

*Bảng 1. Hiệu suất phản ứng tạo phức DSS-DA-EAH 4B*

| Thí nghiệm | DA (mg) ban đầu | DA (mg) trong phức hợp DSS-DA-EAH 4B | Hiệu suất phản ứng (%) |
|------------|-----------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1          | 2,0             | 2,00                                 | 100                    |
| 2          | 2,0             | 2,00                                 | 100                    |
| 3          | 2,0             | 1,99                                 | 99,5                   |
| Trung bình |                 |                                      | 99,83                  |

Hình 2 trình diễn chỉ số OD ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) của các phân đoạn sau sắc ký ái lực miễn dịch với dịch qua cột là dung dịch 1 mg/ml kháng thể chuẩn kháng DA. Kết quả này cho thấy, chỉ có duy nhất một đỉnh xuất hiện ở 3 phân đoạn 49, 50 và 51, trùng với thời điểm sử dụng dịch giải cột là dung dịch đệm Ldy-HCl (pH 2,7) 0,1 M. Như vậy, kháng thể kháng DA chuẩn bắt giữ trên cột đã được giải hấp phụ bằng cách thay đổi pH của dung dịch giải hấp phụ từ trung tính (7,4) sang axit (2,7) theo nguyên tắc sắc ký ái lực miễn dịch [14]. Ở đây, trong môi trường axit, liên kết S-H giữa -NHS ester của phức chất pha rắn DA-DSS đang gắn với gốc -COOH của hạt EAH 4B đã bị bẻ gãy. Với 2 mL dung dịch kháng thể chuẩn ban đầu (1 mg/ml) có chỉ số OD ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )  $1,397 \pm 0,006$  (n=3), sau khi qua cột IAC và đưa về cùng thể tích, dung dịch này có chỉ số OD tương ứng là  $1,278 \pm 0,005$  (n = 3). Từ kết quả so sánh chỉ số OD trước và sau qua cột của dung dịch kháng thể chuẩn, hiệu suất thu hồi của cột được tính toán đạt giá trị  $91,5 \pm 1,5\%$  (n = 3). Hiệu suất này thấp hơn các kết quả thử nghiệm chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch với pha rắn là các kháng nguyên thông thường khác [20]. Nguyên nhân có thể do sự khác biệt về số lượng và bản chất các nhóm hoạt tính của pha rắn khác nhau. Trong nghiên cứu này, kháng thể được bắt giữ trên cột IAC bằng phản ứng của 2 gốc NHS ester trong phân tử DSS [15] với các nhóm -NH<sub>2</sub> của phân tử kháng thể nên xác suất bắt giữ cũng có số lượng giới hạn nhất định. Trong khi đó, đối với các pha rắn kháng nguyên khác, nguyên tắc bắt giữ kháng thể trên cột lại dựa vào phản ứng kết hợp của rất nhiều nhóm -NH<sub>2</sub> trong phân tử kháng thể và nhiều

nhóm -COOH trong phân tử kháng nguyên [19], do đó sẽ có xác suất bắt giữ cao hơn. Đây chính là điểm khó khăn nhất khi sử dụng giá bắt kháng thể là bán kháng nguyên. Tuy nhiên, kết quả thực nghiệm thu được đã cho thấy, lần đầu tiên đã chế tạo thành công cột sắc ký ái lực bắt kháng thể kháng DA.



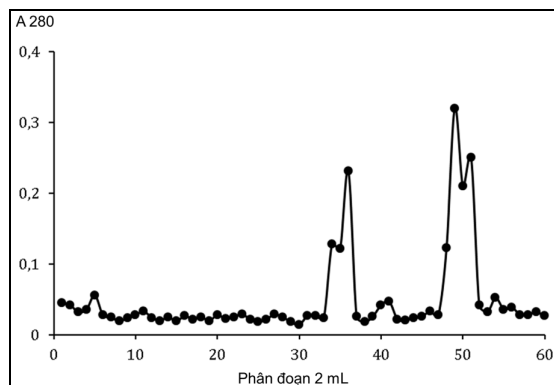
Hình 2. Chỉ số mật độ quang (OD) ở bước sóng 280 nm của các phân đoạn sau sắc ký ái lực miễn dịch với dung dịch kháng thể chuẩn kháng DA 1 mg/ml

### Tinh sạch kháng thể kháng DA trong huyết thanh thỏ trắng

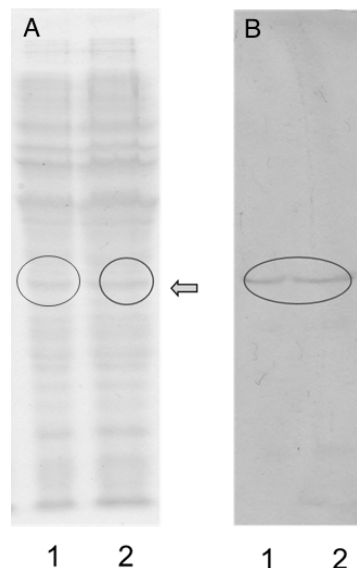
Kết quả kiểm tra chỉ số OD của các phân đoạn sau sắc ký từ 10 ml huyết thanh thỏ trắng cho thấy xuất hiện 2 đỉnh hấp thụ bước sóng 280 nm (đặc trưng cho protein) ở các phân đoạn 34-36 và 48-51 (hình 3). Kết quả kiểm tra bằng Western Blot, không xuất hiện vạch nào đối với chế phẩm của các phân đoạn 34-36. Điều này chứng tỏ, chất này không phản ứng với kháng thể đặc hiệu the 2<sup>nd</sup> antibody IRDye 680RD Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L). Từ kết quả thực nghiệm này cho phép xác định phân đoạn 34-36 không chứa kháng thể kháng DA. Đây có thể là một protein nào đó trong huyết thanh thỏ có nhóm chức hóa học nào đó có thể phản ứng được với gốc -NHS của DSS nên được giữ lại trên cột. Ngược lại, đỉnh phân đoạn 48-51 có thời gian lưu trên cột khá tương đồng với kết quả thu nhận được trong quy trình sắc ký ái lực với kháng thể chuẩn (phân đoạn 49-51).

Kết quả Western Blot ghi nhận chế phẩm của phân đoạn 48-51 biểu hiện một vạch duy

nhất có khối lượng phân tử tương đương với kháng thể kháng DA chuẩn (hình 4).



Hình 3. Chỉ số mật độ quang (OD) ở bước sóng 280 nm của các phân đoạn sau sắc ký ái lực miễn dịch với 10 mL huyết thanh thỏ trắng



Hình 4. Hình ảnh gel SDS-PAGE sau khi nhuộm CBB (A) và màng PDVF sau Western Blot (B) của: 1) kháng thể kháng DA chuẩn; 2) chế phẩm thu nhận từ huyết thanh thỏ sau tinh chế qua cột IAC

Như vậy, có thể khẳng định sản phẩm thu nhận từ phân đoạn 48-51 chứa kháng thể kháng DA. 1 ml dung dịch đệm PBS 0,1 M chứa chế phẩm đông khô của phân đoạn 48-51 có chỉ số OD ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) là 0,311; tương ứng với 0,223 mg kháng thể (tính theo kháng thể chuẩn). Kết quả kiểm tra độ tinh sạch cho thấy

sản phẩm kháng thể này đạt độ tinh sạch tương đương với chất chuẩn (hình 4), đủ điều kiện để sử dụng làm vật liệu cho bộ kit ELISA.

## KẾT LUẬN

Bằng cách sử dụng cầu nối hóa học DSS, đã chế tạo thành công cột sắc ký ái lực miễn dịch sepharose EAH 4B có pha rắn (giá bắt kháng nguyên) là bán kháng nguyên DA với hiệu suất thu hồi đạt  $91,5 \pm 1,5\%$  ( $n = 3$ ). Cột chế tạo đã được ứng dụng để tinh chế thành công kháng thể kháng độc tố DA từ huyết thanh thô trắng sau liệu pháp gây miễn dịch. Sản phẩm kháng thể thu nhận được có độ tinh sạch đạt yêu cầu sử dụng làm cơ chất của bộ kit ELISA. Thành công trong chế tạo cột sắc ký ái lực miễn dịch với giá bắt kháng thể là bán kháng nguyên DA và ứng dụng cột này để tinh chế kháng thể kháng DA là bước quan trọng để chủ động nguồn nguyên liệu sản xuất bộ KIT ELISA nhằm phát hiện nhanh sự có mặt của độc tố này trong sản phẩm thủy sản tại Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Nhà nước 2013-2016 “Nghiên cứu phát triển bộ kit phát hiện nhanh một số độc tố vi tảo trong sản phẩm thủy sản” thuộc chương trình trọng điểm ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ohfuné, Y., and Tomita, M., 1982. Total synthesis of (-)-domoic acid. A revision of the original structure. *Journal of the American Chemical Society*, **104**(12), 3511-3513.
2. Perl, T. M., Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, J. C., Todd, E. C., and Remis, R. S., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine*, **322**(25), 1775-1780.
3. Sutherland, R. J., Hoising, J. M., and Whishaw, I. Q., 1990. Domoic acid, an environmental toxin, produces hippocampal damage and severe memory impairment. *Neuroscience letters*, **120**(2), 221-223.
4. IOC Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae, 2016. <http://www.bi.ku.dk/ioc>
5. Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C. V., Huyen, N. T. M., Hoi, N. C., Fukuyo, Y., and Kodama, M., 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in So Son, Vietnam. *Journal of Phycology*, **36**(6), 1057-1060.
6. Hallegraeff, G., 1995. Harmful algal blooms: A global overview. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, 1-22.
7. Takata, Y., Sato, S., Ha, D. V., Montojo, U. M., Lirdwitayaprasit, T., Kamolsiripichaiorn, S., Kotaki, Y., Fukuyo, Y., and Kodama, M., 2009. Occurrence of domoic acid in tropical bivalves. *Fisheries Science*, **75**(2), 473-480.
8. Dao, H. V., Takata, Y., Omura, T., Sato, S., Fukuyo, Y., and Kodama, M., 2009. Seasonal variation of domoic acid in a bivalve *Spondylus versicolor* in association with that in plankton samples in Nha Phu Bay, Khanh Hoa, Vietnam. *Fisheries Science*, **75**(2), 507-512.
9. Ha, D. V., Lim, P. T., Ky, P. X., Takata, Y., Teng, S. T., Omura, T., Fukuyo, Y., and Kodama, M., 2014. Diatom *Pseudo-nitzschia* cf. *caciantha* (Bacillariophyceae), the Most Likely Source of Domoic acid Contamination in the Thorny Oyster *Spondylus versicolor* Schreibers 1793 in Nha Phu bay, Khanh Hoa province, Vietnam. *Asian Fisheries Science*, **27**, 16-29.
10. Dao, H. V., Phan, V. B., Teng, S. T., Uchida, H., Leaw, C. P., Lim, P. T., Suzuki, T., and Ky, P. X., 2015. *Pseudo-nitzschia fukuyoi* (Bacillariophyceae), a domoic acid-producing species from Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. *Fisheries Science*, **81**(3), 533-539.
11. Hage, D. S., Phillips, T. M., 2006. Chapter 6: Immunoaffinity chromatography. In: Hage, D. S. (ed.). *Handbook of Affinity Chromatography*. NY, USA: Taylor &

- Francis*. Provides an indepth look at immunoaffinity chromatography, with an emphasis on method development, immunoextraction and sample analysis by immunoaffinity chromatography, 127-172.
12. Moser, A. C., and Hage, D. S., 2010. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, **2**(4), 769-790.
  13. Gupta, M. N., and Roy, I., 2013. Affinity-Based Separation: An overview. In: Gupta, M. N., and Roy, I. (eds). *Method for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins*. Springer, 1-15.
  14. Fahrner, R. L., and Blank, G. S., 2013. Perfusion affinity chromatography for rapid antibody separations. In: Gupta, M. N., and Roy, I. (eds). *Methods for Affinity-Based Separations of Enzymes and Proteins*, Springer, 29-64.
  15. Hermanson, G. T., 2013. Bioconjugate Techniques. 3<sup>rd</sup> edition. Elsevier, pp. 1095.
  16. Takata, Y., 2006. Nghiên cứu cơ chế tích lũy độc tố domoic acid trong sinh vật nhuyễn thể. *Luận văn tiến sĩ, Đại học Kitasato, Japan*. (tiếng Nhật).
  17. Kodama, M., and Kotaki, Y., 2005. Domoic acid. *Shokuhin Eisei Kensa Shishin (The Manual for the method of Food Sanitation Test)*, Tokyo, 666-673.
  18. Valencia-Gonzalez, M. J., & Diaz-Garcia, M. E. (1996). Flow-through fluorescent immunosensing of IgG. *Ciencia*, **4**, 29-40.
  19. Đào Việt Hà, 2016. Thăm dò khả năng sản sinh kháng thể kháng độc tố vi tảo domoic acid của thỏ trắng New Zealand. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, **16**(2), 176-182.
  20. Mönster, A., Hiller, O., Grüger, D., Blasczyk, R., and Kasper, C., 2011. Isolation and purification of blood group antigens using immuno-affinity chromatography on short monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, **1218**(5), 706-710.

## APPLICATION OF IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR PURIFICATION OF ANTIBODY AGAINST DOMOIC ACID PRODUCED IN NEW ZEALAND WHITE RABBIT'S SERUM

Dao Viet Ha, Pham Xuan Ky

*Institute of Oceanography, VAST*

**ABSTRACT:** In order to develop an ELISA KIT for detection of domoic acid (DA) in seafood in Vietnam, DA antibody was produced by immunizing in New Zealand white rabbit using DA-DSS (disuccinimidyl suberate)-BSA (Bovine Serum Albumin) as an antigen. The DA antibody in rabbit's serum was purified for its use as a material of ELISA KIT. In antibody/antigen purification process, immunoaffinity chromatography (IAC) is considered as the best method by both its specification and ability to enrich antibody. However, DA is a hapten, and it is impossible to apply a regular immunizing principal for making an IAC column with DA as a solid phase to catch DA antibody. This paper presents a trial using polymer sepharose EAH 4B resin (omega-aminohexyl) IAC bound with hapten DA as a solid phase for DA antibody purification from rabbit's serum. Using DSS as a chemical linker; then, based on the reaction between a carboxyl group of DA and a carbodiimide group of the resin EAH 4B, we were successful to make the IAC column with DA-DSS as the solid phase. Recovery ratio of the made IAC column reached  $91.5 \pm 1.5\%$  ( $n = 3$ ) to capture the antibody against DA standard. DA antibody from white rabbit's serum was eluted successfully using this column with 0.5 M NaCl; 0.1 M PBS and then, 0.1 M Ldy-HCl solutions (pH 2.7). The obtained antibody was qualified by Western Blot using a specific reaction with the 2<sup>nd</sup> specific antibody HRP-labeled anti-goat IgG and the confirmed result revealed that it can be used as ELISA KIT material.

**Keywords:** Antibody, domoic acid, immunoaffinity chromatography, productivity, purification.